Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

ALLOGENE MEMBRANANTIGENE VOM I a - TYP (HLA - DR) AUF EINER SUBPOPULATION MENSCHLICHER T-LYMPHOZYTEN

IMMUNFLUORESZENZOPTISCHER NACHWEIS MIT HILFE EINER DREIFACHMARKIERUNG

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

CHRISTINE BETSCH
aus Stuttgart

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0023

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

ALLOGENE MEMBRANANTIGENE VOM I a - TYP (HLA - DR) AUF EINER SUBPOPULATION MENSCHLICHER T-LYMPHOZYTEN

IMMUNFLUORESZENZOPTISCHER NACHWEIS MIT HILFE EINER DREIFACHMARKIERUNG

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

CHRISTINE BETSCH
aus Stuttgart

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. H. Heimann
1.Berichterstatter:	Professor Dr. H.D. Waller
2.Berichterstatter:	Professor Dr. D. Niethammer

gedruckt bei Fa. H.- J. Köhler, Reprografischer Betrieb, 7400 Tübingen

Meinen Eltern

Abkürzungen :

HLA-DR	Haupt-Lymphozyten-Antigen, D-Genort
Ia	Immunantwort-assoziierte Alloantigene
sATG	spezifisches Anti-T-Zell-Globulin
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
EB	Ethidium-Bromid
FDA	Fluoreszein-Diacetat
EDTA	Äthylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
Con A	Concanavalin A
pA	Protein A
CTX-Test	Zytotoxizitätstest
KF-CTX-Test	Kontrastfluoreszenz-Zytotoxizitätstest
MLC	Mixed Lymphocyte Culture
GVH-R	Graft-Versus-Host-Reaktion
HLA	Human Leukocyte Antigen bzw. Histocompatybility Locus Antigen
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1	Einleitung	
1.1	T- und B-Lymphozyten	1
1.2	Membranmarker	2
1.3	Die Ia-Antigene (HLA-DR)	5
1.4	Arbeitskonzept und experimenteller Ansatz ..	7
2	Material	
2.1	Zielzellen	8
2.2	Antikörper	8
2.3	Fluoreszenzmarker	9
3	Methoden	
3.1	Zellpräparationen und Zell-Linien	10
3.2	Herstellung von spezifischem Anti-Human-T-Zell-Globulin (sATG)	11
3.2.1	Immunisierung	11
3.2.2	Absorptionen	11
3.2.3	Isolierung des Gammaglobulins	12
3.3	Herstellung der Fluoreszenzmarker	13
3.3.1	Vorbemerkungen: Eigenschaften des Protein A.	13
3.3.2	FITC-pA	14
3.3.3	TRITC-pA	14
3.4	Der zytotoxische Test (CTX-Test)	15
3.5	Immunfluoreszenztechnische Verfahren zum Nachweis von Ia-Antigenen auf T-Zellen	18
3.5.1	Doppelmarkierung (FITC-pA und TRITC-pA)	19
3.5.2	Dreifachmarkierung (CTX-kombinierte Methode)	21
3.5.3	Weitere und allgemeine Verfahren	24

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Spezifität des sATG 26
4.1.1 Antikörperaktivität vor und nach der Absorption 26
4.1.2 Vergleichende Charakterisierung von Lymphozytenpopulationen mit sATG und anderen Markern 31
4.2 Beobachtungen an Einzelabsorptionen 33
4.3 Ia-positive T-Zellen 36
4.3.1 Ergebnisse mit der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung 36
4.3.2 Ergebnisse mit der Dreifachmarkierung 38

5 Diskussion

5.1 Problemkreis 40
5.2 Verfahren zum Nachweis Ia-positiver T-Zellen 44
5.3 Die Spezifität des Anti-T-Zell-Globulins.. 46

6 Zusammenfassung 49

7 Literaturverzeichnis 53

1 EINLEITUNG

1.1 T- und B-Lymphozyten

Lymphozyten sind Blutzellen, welche aufgrund ihrer Zusammenarbeit die Regulation der Immunantwort tragen. Sie erkennen spezifisch Antigene bzw. Antigendeterminanten und werden auch als antigensensitive oder immunkompetente Zellen bezeichnet (17).

Durch den Nachweis verschiedener Zellmembran-Marker mit Hilfe der Immunfluoreszenz sowie durch Techniken der Zelltrennung und durch in-vitro Funktionsmodelle konnten Lymphozyten in zwei größere Hauptgruppen, T- und B-Lymphozyten unterteilt werden. Beide haben ihre Stammzelle im Knochenmark (32), ihre Differenzierung zu immunkompetenten Zellen erfolgt jedoch in unterschiedlichen Organen: T-Zellen reifen unter dem Einfluß des Thymusepithels, während B-Zellen von einem beim Menschen noch unbekannten Prägungsort (Äquivalent der Bursa Fabricii bei Vögeln) abhängig sind (14), (51).

Bei einer Immunreaktion haben T- und B-Lymphozyten verschiedene Funktionen. B-Lymphozyten sind die Vorstufen der Antikörper-produzierenden Plasmazellen (humorale Immunität), wohingegen T-Lymphozyten für zellgebundene Immunphänomene verantwortlich sind, wie sie bei der Immunität gegen Tbc-Bakterien, bei der Allergie vom verzögerten Typ, Abstoßung von Allotransplantaten und Graft-versus-Host-Reaktionen eine Rolle spielen (14).

Für das Zustandekommen einer humoralen Immunantwort ist die Kooperation von T- und B-Zellen notwendig. Dabei kommt einem größeren Teil der T-Lymphozyten eine "Helfer-Funktion" zur spezifischen Antikörperbildung zu, in-

dem sie auf Antigenkontakt hin die B-Lymphozyten zur Antikörperbildung stimulieren. Insbesondere im Tiermodell, bei Ratte und Maus, hat es sich gezeigt, daß die Zusammenarbeit der Lymphozyten von den Genorten gesteuert wird, die auch die Histokompatibilität bestimmen. Damit rückt das immungenetische HLA-System des Haupthistokompatibilitätskomplexes auf Chromosom 6 beim Menschen für die Immunologie stark in den Vordergrund (4).

Eine weitere Funktion der T-Zellen besteht in einer Regulation der Immunantwort durch Suppression. Wie verschiedene Untersuchungen an Ratten ergaben, wird die Antikörpersynthese unter bestimmten Bedingungen durch T-Zellen auch gehemmt (36),(47). Verschiedentlich konnte ein spezieller T-Zell-Faktor nachgewiesen werden, der Suppressor-Eigenschaft besitzt (25),(49),(50),(48),(23).

Man nimmt an, daß die beschriebenen T-Zell-Eigenschaften distinkten funktionellen Untergruppen zuzuordnen sind, und bezeichnet sie als Helfer- bzw. Suppressor-T-Zellen (43),(37),(34),(9).

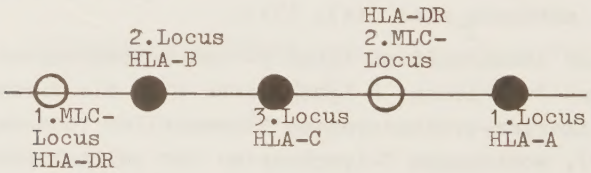

Abb.1: Schematische Darstellung der HLA- und MLC-Genorte des Haupthistokompatibilitätskomplexes auf Chromosom 6 des Menschen.

1.2 Membranmarker

Um Informationen über die Eigenschaften von T- und B-Zellen und ihre Rolle innerhalb der Immunreaktion gewin-

nen zu können, ist es wichtig, die beiden Zelltypen zuverlässig zu identifizieren und experimentell zu isolieren. Dies ist anhand verschiedener charakteristischer Membranmarker möglich: nur die T-Zellen besitzen die Fähigkeit zur spontanen Rosettenbildung mit Hammelerythrozyten (27),(65). Daneben tragen sie auf ihrer Oberfläche T-Zell-spezifische Membranantigene (26),(45). Diese beim Menschen noch nicht näher definierten T-Zell-Determinanten sind mit Hilfe heterologer Anti-T-Zell-Seren nachweisbar (2),(40),(51),(38),(64).

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Herstellung eines solchen heterologen Anti-T-Zell-Serums, das nach einer geeigneten Absorption ausschließlich mit menschlichen T-Lymphozyten reagierte.

Im Unterschied zu T-Zellen zeichnen sich B-Zellen durch hohe Konzentrationen an zellständigen Immunglobulinen aus (62), die als spezifische Antigenrezeptoren dienen (11),(32). Weitere B-Zell-Marker sind Rezeptoren für das Fc-Fragment bestimmter Immunglobuline (12), Komplementrezeptoren (20) und Rezeptoren für das Epstein-Barr-Virus (66).

Angemerkt werden muß, daß die meisten Membranmarker Differenzierungsmarker sind und nur in ganz bestimmten Stadien der Zelldifferenzierung T- bzw. B-Zell-spezifisch sind (1). Beispielsweise verlieren bestimmte B-Zellen, die sich zu Plasmazellen differenzieren, den Fc-Rezeptor, während er sich bei stimulierten und zu Blasten transformierten T-Zellen ausbildet (1), (46). Ebenso konnten vor kurzem auch die Komplementrezeptoren als Differenzierungsmarker nachgewiesen werden (61).

Wichtig ist unter Umständen auch noch eine sehr kleine

Gruppe von Lymphozyten, die ihrer Oberflächenstruktur nach weder den T- noch den B-Lymphozyten zugeordnet werden kann, die Gruppe der sogenannten O-Zellen (6).

Als neue Membranmarker wurden in den letzten Jahren Determinanten der B-Zellen beschrieben (59),(57),(63), (41), die den von Shreffler et al. (44) bei der Maus als Ia-Alloantigene bezeichneten Determinanten vergleichbar sind.

Verschiedene Laboratorien konnten beim Menschen, aber ausführlicher bei der Maus die Charakteristika dieser Ia-Determinanten beschreiben (42),(21). Es wurde nachgewiesen, daß diese in das H-2 - System eingegliederten Alloantigene in der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen (10),(29),(35).

Tab.1: Membranmarker

Membranmarker	T-Zelle	B-Zelle
zellgebundenes Ig	-	+
Fc-Rezeptor	(+)	+
Komplementrezeptor	-	+
EBV-Rezeptor	-	+
T-Zell-spezifische Membranantigene	+	-
Rezeptor für E-Rosetten	+	-
Ia(HLA-DR)-Alloantigene	?[1]	+
HLA-Alloantigene	+	+

[1] Thematik dieser Dissertationsarbeit

1.3 Die Ia-Antigene (HLA-DR)

Die Membranantigene vom Ia-Typ sind Alloantigene, die zunächst auf B-Lymphozyten, später auch auf Mikrophagen und einigen nicht-lymphoiden Zellen nachgewiesen wurden (22),(59). Wie man durch Untersuchungen am analogen Histokompatibilitätssystem der Maus (H-2) weiß, werden die Ia-Antigene von Genen kontrolliert, die mit der sogenannten I-Region des MHC (Major Histocompatibility Complex) assoziiert oder Teil von ihr sind (18),(54). Dies führte zu der Bezeichnung "I-region associated antigens" (Ia),(21).

Die I-Region, in der sich auch die für die Immunantwort gegen zahlreiche Antigene verantwortlichen Ir-Gene (immune response genes) befinden (21), trägt eine Reihe von Funktionen: Die Stimulation im MLC-Test, die Graft-Versus-Host-Reaktionen und die Abstoßung von Hauttransplantaten (34),(31),(18),(54),(22).

Die Ia-analogen Antigene werden von Alloantikörpern erkannt, die man in HLA-A,B,C-absorbierten Seren von Schwangeren findet (56). Mit Hilfe dieser Alloantikörper konnten serologisch bisher 8 Ia-HLA-DR-Spezifitäten definiert (9) und ihre strikte Assoziation zu den HLA-D Locus Determinanten der gemischten Leukozytenkultur festgestellt werden (55). Ihre enge Verwandtschaft oder gar mögliche Identität konnte in MLC-Hemmversuchen erwiesen werden (58).

Weiterhin konnten Hinweise erbracht werden, daß Ia-Antigene auch an der physiologischen T-/B-Zell-Interaktion und der Immunregulation beteiligt sind (41),(37).

Bei der Maus sind zumindest einige der Ia-Antigene auch auf Subpopulationen von T-Lymphozyten zu finden (16), (15),(18). Von besonderem Interesse ist dabei seit neuestem die T-Zell-Subpopulation, die eine gezielte Hemm-

wirkung auf die Immunantwort ausüben kann (34).

Ungeklärt war bisher, ob auch auf T-Zell-Subpopulationen des Menschen solche Ia-Antigene vorhanden sind, die ja zunächst als primäre B-Zell-Determinanten galten (28).

Erste Ergebnisse zu dieser Frage konnten von uns bereits publiziert werden (60): experimentell im MLC-Versuch oder durch Mitogene wie Con A stimulierte menschliche T-Lymphozyten zeigten zum Teil Reaktionen mit Anti-Ia-Seren, d.h. die Inkubation der T-Zellen mit spezifischen Anti-HLA-DR-Seren und Komplement hatte den Ausfall der Suppressor-T-Zell-Funktion zur Folge.

Ob eine Reaktion mit Anti-Ia-Seren auch bereits bei nicht experimentell stimulierten T-Zellen zu finden ist, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Hierdurch ergäbe sich eine eventuell diagnostisch verwertbare Aussage über das Vorliegen einer bestimmten Suppressor-Zell-Komponente in der T-Zell-Population, die wesentlichen Einfluß auf den Ablauf einer Immunantwort hat und sich durch Antigenstimulation nur noch amplifiziert.

1.4 Arbeitskonzept und experimenteller Ansatz

In der vorliegenden Untersuchung ging es folglich primär um die Frage, ob und in welchem Umfang Membranantigene vom Ia-Typ (HLA-DR) auf bestimmten menschlichen T-Lymphozyten des peripheren Blutes und der Tonsillen zu finden sind, die nicht zuvor im Experiment stimuliert wurden.

Um diese Untersuchung durchführen zu können, mußte zunächst als sicherer serologischer Marker für T-Zellen durch geeignetes Absorbieren im Kaninchen ein T-Zell-spezifisches Heteroantiserum hergestellt und für weitere Experimente das spezifische Immunglobulin isoliert werden (sATG). In Komplement-abhängigen zytotoxischen Tests wurde die Spezifität des Antikörpers für T-Zellen nachgewiesen.

Unter Verwendung dieses spezifischen sATG zusammen mit heterologen und homologen Ia-Alloantiseren entwickelten wir auf der Grundlage der Immunfluoreszenz ein Doppelmarkierungsverfahren, mit dem in gemischten T- und B-Zellpopulationen Ia-Positivität und T- bzw. B-Eigenschaft der Zellen simultan nachweisbar sind.

In einem zweiten Verfahren kombinierten wir immunfluoreszenztechnische T- bzw. B-Zell-Markierung mit einer Behandlung mit Anti-Ia-Seren und Komplement, um die Ia-Alloantigene auf T-Zellen auch auf zytotoxischem Wege nachzuweisen.

2 MATERIAL

2.1 Zielzellen

In unseren Studien über das zelluläre Verteilungsmuster der Ia-(HLA-DR)-Antigene wurden Lymphozytenpopulationen mit unterschiedlichem T-Zell-Anteil, die nicht durch Mitogene oder im MLC-Test stimuliert worden waren, untersucht.

1. Periphere Blutlymphozyten von zwei gesunden Spendern mit bekanntem homozygotem HLA-DR Typ ("Ves 6": DRW2; "Mau": DRW3)
2. Tonsillenlymphozyten von zwei tonsillektomierten Patienten der HNO-Klinik (als Tons.I- und Tons.II-Lymphozyten bezeichnet)

Als negative Kontrollgruppe mit einem T-Zell-Anteil unter 2% wurden Lymphozyten von einem Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ (CLL-"632") untersucht.

2.2 Antikörper

Für die unter 3.4 beschriebenen immunfluoreszenztechnischen Nachweisverfahren verwendeten wir die folgenden spezifischen Antikörper:

1. Ein von uns hergestelltes spezifisches heterologes Anti-Human-Zell-Globulin (sATG) vom Kaninchen.
2. Spezifische Anti-Ia-Sera (plättchenabsorbiert) aus dem Gewebetypisierungslabor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen:
   a heterologes Anti-Human-Ia Nr. 002 vom Kaninchen (Oxford)
   b homologes Anti-Ia Nr. 770 mit einer dem HLA-DR Typ

DRW2 assoziierten Spezifität und
c homologes Anti-Ia Nr. 277 mit einer DRW3 - assoziierten Spezifität, beide aus Schwangeren-Seren.

3. Anti-Human IgG vom Schaf, Fluoreszein-konjugiert (Firma Wellcome).
4. Anti-C_4: spezifisches Anti-C_4-Serum, das gegen die 4. Komplementkomponente gerichtet ist und somit spezifisch eine Lymphozytenpopulation identifiziert, auf deren Oberfläche C_4-Rezeptoren ausgeprägt sind. Dieses sind in aller Regel B-Zellen.

Das hier verwendete Antiserum wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Otto Götze (La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt.

2.3 Fluoreszenzmarker

Als Fluoreszenzmarker verwendeten wir den Rotfluoreszenzfarbstoff TRITC sowie den Grünfluoreszenzfarbstoff FITC, jeweils konjugiert mit Protein A (siehe auch Abschnitt 3.3).

TRITC: Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
FITC: Fluoreszein-Isothiocyanat, Isomer I, BBL
(Firma Becton, Dickinson and Company, USA).

Protein A (p-A) von der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

Im zytotoxischen Test diente Ehidium-Bromid (Sigma Chemical Company) als Indikator für abgetötete Zellen.

3 METHODEN

3.1 Zellpräparationen und Zell-Linien

Periphere Blutlymphozyten. Aus peripherem Blut von gesunden Personen und Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie wurden die Lymphozyten nach einer Methode von Böyum (5) isoliert. Dazu wurde das heparinisierte Blut mit normaler Hanks-Salzlösung (Calcium- und Magnesiumfrei) 1:1 verdünnt und in Reagenzgläsern auf eine Schicht von Ficoll-Isopaque aufgelegt. Die nach dem Zentrifugieren in der Interphase erscheinenden Lymphozyten wurden mit der Pasteurpipette herausgenommen und dreimal in Hanks-Salzlösung gewaschen.

Thymus und Tonsillen[1]. Das Thymusgewebe stammte von Kindern unter 6 Jahren, die sich einer Herzoperation zu unterziehen hatten. Tonsillen erhielten wir bei Tonsillektomien aus der HNO-Klinik Tübingen.
Die Gewebe wurden gesäubert, mit Schere oder Scalpell zerkleinert und durch ein enges Drahtnetz gepresst. Als Suspensionsmedium diente RPMI-1640 mit Zusatz von Glutamin und Penicillin/Streptomycin. Zur Abtrennung der Lymphozyten von Erythrozyten-Beimischungen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Isopaque durchgeführt (für 45 min. bei 400g Interphase und 20° C). Nach

[1]Wir sind Herrn Prof.Dr.med. H.-E. Hoffmeister (Chirurgische Universitätsklinik Tübingen) und Herrn Prof.Dr.med. D. Plester (Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten Tübingen) für das großzügige Überlassen von Thymusgewebe bzw. Tonsillen-Operationsmaterial sehr zu Dank verpflichtet.

drei Waschvorgängen in Hanks-Salzlösung resuspendierten wir die zu Immunisierungen vorgesehenen Thymozyten in physiologischer Kochsalzlösung.

Lymphoblastoide Zell-Linien. Bei 37°C und 5% CO_2-Zufuhr züchteten wir, wie in der Literatur beschrieben (20), die lymphoblastoiden B-Zell-Linien vom Typ RPMI-8866, -1788 und-Nc 37 sowie die T-Zell-Linien $Molt_4$ und Jurkat je nach benötigter Menge in stehenden Kulturflaschen oder in einem Rollinkubator im 1000-ml Glasflaschen. Als Suspensions- und Nährmedium verwendeten wir RPMI-1640, angereichert mit 10% fetalem Kälberserum. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen alle zwei Tage ausgetauscht und das Volumen jeweils so vermehrt, daß die Zellkonzentration einen Wert von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml nicht überschritt.

3.2 Herstellung von spezifischem Anti-Human-T-Zell-Globulin (sATG)

3.2.1 Immunisierung. Anti-Human-Thymozyten-Seren wurden in 3 Kaninchen erzeugt. Wir hielten uns dabei im Wesentlichen an die Methode von Rodt et al. (39). Jedes Tier erhielt intravenös eine Menge von 1×10^8 Thymozyten als Antigen, suspendiert in physiologischer Kochsalzlösung und in einer Konzentration von $0,5 \times 10^8$ Zellen/ml. Im Abstand von zwei und drei Wochen zur Erstinjektion wurden die Kaninchen mit derselben Thymozytenmenge geboostet, das Blut eine Woche nach der letzten Injektion entnommen und Serum daraus gewonnen. Bis zur Absorption wurden die drei Seren bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2 Absorptionen. Um die heterologen Anti-Thymozytensera T-Zell-spezifisch zu machen, wurden unspezifische Antikörper, wie in der Literatur beschrieben (51), (6),

durch umfangreiche Absorptionen entfernt. Wir verwendeten zur Absorption zunächst menschliche Erythrozyten, dann die lymphoblastoiden B-Zell-Linien RPMI-1788, -8866 und -Nc 37 sowie einen Pool menschlicher Blutplättchen. Ein Absorptionsprotokoll verläuft folgendermaßen: gewaschene A-, B- und O-Erythrozyten[1] wurden, zu gleichen Teilen gemischt, mit dem Serum in einem Volumenverhältnis von 1:1 versetzt und im Eisbad bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden Serum und Zellen durch 20 min. Zentrifugieren bei 200g und 4°C getrennt.

Die Absorption mit den lymphoblastoiden B-Zell-Linien RPMI-1788, -8866 und -Nc 37 wurde nach demselben Prinzip durchgeführt, je Zell-Linie und ml Serum verwendeten wir eine Menge von 2 x 10^8 Zellen (6). Die Antisera wurden absorbiert, bis sich keine zytotoxische Aktivität gegen die betreffenden Zell-Linien mehr zeigte. Es stellte sich heraus, daß in der Regel zwei solche Absorptionsschritte notwendig waren.

Die zusätzliche Plättchenabsorption wurde an der aus einem der Seren isolierten Gammaglobulinfraktion gemäß (24) ausgeführt: in kleinen Aliquots von 5ml absorbierten wir das Gammaglobulin (Konzentration: 1mg/ml) mit den gepoolten menschlichen Blutplättchen im Volumenverhältnis von 1:1. Die Plättchen wurden dabei in drei Etappen für je-

[1]Wir sind Herrn Prof. Dr. med. W. Schneider (Abteilung für Transfusionswesen der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen) für das großzügige Überlassen von Human-Erythrozyten sowie größerer Mengen von angereicherten Blutplättchen sehr zu Dank verpflichtet.

weils 1 Stunde mit dem Gammaglobulin inkubiert. Nach Entfernung der Plättchen durch 20 min. Zentrifugieren bei 200g wurde der Überstand zur Abtrennung von Zelltrümmern und Aggregaten in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge bei 15 000 UpM 1 Stunde lang scharf zentrifugiert. Während des gesamten Absorptionsvorganges wurden Temperaturbedingungen von 4°C eingehalten.

Die aus dem Blut gesunder Spender isolierten Plättchen waren in ihrer Spezifität und Funktionsfähigkeit im Gewebetypisierungslabor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen während des "7. Internationalen Histokompatibility Workshop" (Oxford 1977) getestet und verwendet worden.

3.2.3 Die Isolierung des Gammaglobulins mit DEAE-Zellulose erfolgte nach Campbell et al. (7). Das Kaninchenantiserum wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt, wobei Globuline gefällt werden, Albumine im Überstand verbleiben. Nach 20 min. Zentrifugieren bei 3000 UpM und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat in einem NaCl/-Na_3PO_4 - Puffer (pH 7,5) aufgelöst und gegen denselben Puffer über Nacht dialysiert. Danach wurde die Globulinlösung zur Abtrennung des Gammaglobulins dreimal mit DEAE-Zellulose, die mit demselben Puffer äquilibriert war, im "Batch-Verfahren" behandelt (für jeweils 30-60 min. bei 4°C und unter gleichmäßigem Umrühren mit Hilfe eines Magnet-Rührgeräts). Das Filtrat wurde durch Büchner-Trichter gesammelt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode findet sich in der oben genannten Literaturstelle.

Zur Reinheitskontrolle des Gammaglobulins wendeten wir den Immunodiffusionstest nach Ouchterlony (nach Backhausz (3)) an. Mit beiden Testantiseren (Ziegen-Anti-Ka-

ninchen-Ig und -IgG) zeigte sich eine einzige Präzipitationslinie, die des IgG.

In einem Leitz Spektrophotometer bestimmten wir die optische Dichte der Proteinlösung bei 280 nm und errechneten daraus die Konzentration des IgG mit 1 mg/ml.

3.3 Herstellung der Fluoreszenzmarker (Fluorochromkonjugation von Protein A)

3.3.1 Vorbemerkungen: Eigenschaften von Protein A (pA). Protein A, ein Protein aus der Zellwand von Staphylokokkus aureus, reagiert selektiv mit der Fc-Region von verschiedenen IgG-Molekülen der phylogenetischen Reihe, beim Menschen mit der Fc-Region der IgG-Subklassen 1, 2 und 4. Die eigentliche Bindungsstelle innerhalb der Fc-Region ist noch nicht bekannt. Protein A wird in dieser Bindung als mindestens bivalent angesehen und zeichnet sich durch hohe Affinität zum Fc-Teil und Stabilität der Bindung aus. Es hat Bedeutung als Marker für zellständiges IgG. Diese direkte Bindung von Protein A an IgG auf der Oberfläche IgG-produzierender Zellen ist jedoch gering im Vergleich mit der Bindung, die man erhält, wenn man vor der Zugabe von Protein A IgG in der Form von Antikörpermolekülen zur Bindung an Zelloberflächenantigene bringt (13).

In dieser letztgenannten Form verwendeten wir 2 Proben von Protein A, konjugiert an kontrastierende Fluorochrome, als einfache und stabile Marker für zwei verschiedene Antikörper, Marker, die zugleich die (Komplement-abhängige) zytotoxische Aktivität des betreffenden Antikörpers verhindern und so die Verwendung des intakten Antikörper-Moleküls auch in Gegenwart von Komplement erlauben.

3.3.2 FITC-pA.

Die Konjugation des FITC an pA führten wir nach der Methode von Dorval et al. (13) durch: Aliquots von Protein A, durch Zugabe von 0,1mNaOH/0,15m NaCl auf pH 9,0 eingestellt, wurden mit 2,8 Mol FITC/Mol Protein versetzt und für 60 min. in der Dunkelheit und bei einer Temperatur von 23°C auf einen Magnetrührer gestellt. Durch Zugabe von 0,1m NaOH/0,15m NaCl wurden dabei pH-Bedingungen von 9,0 - 9,5 eingehalten. Das FITC-markierte pA wurde dann mehrmals bei 4°C gegen BSS (buffered salt solution) dialysiert, auf eine Konzentration von 1mg/ml gebracht und bei - 20°C in der Dunkelheit aufbewahrt.

3.3.3 TRITC-pA.

In derselben Weise wie beim FITC-pA gingen wir bei der Konjugation von TRITC an Protein A vor. Entsprechend dem höheren Molekulargewicht von TRITC verwendeten wir hier jedoch nur 2,4 - 2,5 Mol des Farbstoffs pro Mol Protein A.

3.4 Der zytotoxische Test : CTX-Test

Im Rahmen der Spezifitätskontrolle der von uns hergestellten Anti-Thymozyten-Sera und des sATG wendeten wir ein Verfahren aus der in vitro Histokompatibilitäts-Testung in modifizierter Form an, den zytotoxischen Test. Das Prinzip dieses Test besteht darin, daß man gereinigte Lymphozyten mit einem Antikörper versetzt, wobei entweder die Spezifität der Lymphozyten oder die des Antikörpers bekannt sind. Hat eine Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Zelloberfläche stattgefunden, kommt es in Gegenwart von Komplement zur spezifischen Lyse der betroffenen Zellen. Dies kann z.B. durch Aufnahme von rotfluoreszierendem Ethidium-Bromid ins Zellinnere ange-

zeigt werden.

Zur Bestimmung der Antikörper-Spezifität inkubierten wir die zu testenden Antisera in einer Verdünnungsreihe mit einem Standard von T- und B-Zellen und ermittelten den jeweiligen Antiserum-Titer.

Der Kontrastfluoreszenz-CTX-Test (modifiziert nach Martel et al. (33)):

Dieses empfindliche zytotoxische Verfahren verwendet Fluoreszein-Diacetat (FDA) als Grünfluoreszenzfarbstoff für lebende Zellen und Ethidium-Bromid (EB) als Rotfluoreszenzfarbstoff für abgetötete Zellen.

1 Die mononukleären Zellen werden aus peripherem Blut durch eine Zentrifugation über einen Ficoll-Isopaque-Gradienten isoliert.

2 Die Zellen werden 2 x in Hanks-Salzlösung gewaschen und resuspendiert, gezählt und so verdünnt, daß sich eine Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml ergibt. Von dieser Zellsuspension nimmt man 0,9ml und fügt 0,1ml einer FDA-Lösung hinzu, die folgendermaßen hergestellt wird: Man löst 5mg FDA in 1ml Aceton auf, dann werden 10µl dieser Stammlösung mit 1ml Hanks-Salzlösung verdünnt. Diese Verdünnung wird unmittelbar vor der Verwendung der Lösung durchgeführt.

3 Die Mischung von FDA-Lösung und Zellsuspension wird dann 7 min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

4 8ml einer 3%-igen Rinder-Albumin-Lösung in Hanks-Salzlösung werden zugefügt, die darin enthaltenen Zellen zentrifugiert und anschließend in frischer Hanks-Albumin-Lösung resuspendiert, so daß sie wieder die Konzentration von 3×10^6 Zellen /ml haben.

5 1µl eines spezifischen Antiserums (bzw. einer Verdünnung von diesem) wird jeder Vertiefung einer Tera-

saki-Platte zugesetzt, die zuvor mit 10µl Paraffinöl pro Loch gefüllt wird.

6 1µl von FDA-behandelten Lymphozyten wird zugefügt und die Testplatte für 30 min. bei Zimmertemperatur Lichtabschluß auf einen Schüttler gestellt.

7 5µl unverdünntes Kaninchenkomplement und, nach 10 min., 1µl einer 5%-igen Glycinlösung werden hinzugefügt, und diese Mischung wird für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.

8 1µl von EB in einer Konzentration von 0,005mg/ml, aufgelöst in Veronal-Puffer (pH 7,0), wird zugefügt zu jeder Mikrokultur und weiter für 10 min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

9 1µl einer 0,35%-igen EDTA-Lösung in normaler Kochsalzlösung werden zu jeder Kultur hinzugefügt.

10 Die gesamte Platte wird für 3 min. bei 200g zentrifugiert.

11 Die Testplatte wird auf einem Standard-Fluoreszenz-Mikroskop mit einem BG Exzitations-Filter und einem K 530 Barrieren-Filter gelesen.

12 Bei Ablesung durch das Auge verwendet man die Auszählmethode der Standard N.I.H.-Technik von 1 - 8. Grüne Zellen leben, rote Zellen sind abgetötet.

13 Alternativ wäre der Weg einer automatischen Ablesung über einen elektrischen Photoverstärker, der an einen elektronischen Rechner angeschlossen ist und durch dessen Vorprogrammierung auch automatisch ausgewertet wird.

Zu der oben beschriebenen Methode ist noch folgendes anzumerken:

Wenn die Platten bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt werden, kann der

Test noch bis zu 8 Stunden später gelesen werden, da das verwendete 5%-ige Glycin die Zellmorphologie erhält.

Das verwendete EDTA stoppt die Komplement-Aktivität und neutralisiert außerdem das freie Fluoreszein, wodurch sich im mikroskopischen Bild ein dunklerer Hintergrund ergibt.

Bei Verwendung der empfindlicheren Zell-Linien hat es sich nach unserer Erfahrung bewährt, während des gesamten Verfahrens Temperaturbedingungen von 10-15°C einzuhalten und statt 5µl Komplement nur 3µl zu verwenden.

3.5 Immunfluoreszenztechnische Verfahren zum Nachweis von Ia(HLA-DR)-Antigenen auf T-Zellen.

Die beiden im folgenden beschriebenen Verfahren basieren auf dem Prinzip der Immunfluoreszenz. Wir verwendeten die kontrastierenden Fluorochrome FITC und TRITC und eine spezielle Filterkombination (siehe Abschnitt 3.4), die Rot- und Grünfluoreszenz gleichzeitig erscheinen läßt. Statt eines Fluorochrom-konjugierten "Anti-Antikörpers" wie bei der indirekten Immunfluoreszenz, verwendeten wir zur Markierung von Antigen-Antikörper-Komplexen auf der Zelloberfläche Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertes Protein A, das an den Fc-Teil des Antikörpermoleküls bindet (13).

Die Doppel- bzw. Dreifachmarkierung von Lymphozytendeterminanten in dieser Form wurde speziell für die vorliegende Fragestellung entwickelt und zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

I Das Verfahren der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung diente dem Simultannachweis von T-Zell-spezifischen und Ia(HLA-DR)-Antigenen.

II Das Verfahren der Dreifachmarkierung (mit dem zytotoxischen Test kombiniertes Verfahren) diente der T-/B-Zell-Markierung mit nachfolgender Zytolyse der Ia-positiven Zellen. Die Zytolyse wurde durch Aufnahme von Ethidium-Bromid kenntlich gemacht (57).

Primär und nicht spezifisch lysierte Zellen nehmen ebenfalls Ethidium-Bromid auf.
Dieser falsch-positive "Background" wurde durch die Bestimmung der "Viability" der Zellen nach Ablauf des gesamten Tests an der negativen Kontrolle quantitativ erfaßt und im Ergebnis berücksichtigt.

Die zytotoxische Aktivität der zur Immunfluoreszenzmarkierung verwendeten Antikörper wird durch die Bindung an Protein A verhindert, sodaß Zytotoxizität allein aufgrund einer Reaktion mit freiem Anti-Ia-Serum eintreten kann.

Die optimale Einstellung von Antigen- zu Antikörperkonzentration sowie die geeignete Menge an Fluoreszenz-Markern wurde für beide Verfahren in Vorversuchen eingehend geklärt.

Um eine weitere Quelle falsch-positiven "Backgrounds" zu erfassen, ermittelten wir die Zahl kontaminierender (Ia-positiver) Makrophagen für jede einzelne Zellpopulation jeweils vor den Versuchen. Dies erfolgte durch Bestimmung ihrer Phagozytose-Eigenschaft mit Latexpartikeln (Siehe hierzu Abschnitt 3.5.3).

Als negative Kontrolle wurde bei allen Versuchen eine Probe der entsprechenden Zellen verwendet, die statt mit funktionsfähigen Antikörpern nur mit hitzeinaktiviertem menschlichen AB-Serum vorinkubiert war.

Die "Viability" der Testzellen bestimmten wir durch Trypan-Blau-Ausschluß (siehe hierzu Abschnitt 3.5.3).

3.5.1 Doppelmarkierung (mit FITC-pA und TRITC-pA)

Bei diesen Versuchen wurden T-Zellen durch sATG in Verbindung mit TRITC-pA rot markiert. B-Zellen erschienen durch Anti-Ia-Serum und FITC-pA grün. Doppelpositive Zellen, d.h. Lymphozyten mit T-Zell-Eigenschaft und Ia-Positivität zeigen in diesem Falle gleichzeitig grüne und rote "Cap"-Formationen.

Um eine unspezifische Färbung durch die Bindung von Fluorochrom-konjugiertem Protein A an IgG-produzierende Zellen auszuschließen, wurde mit freiem Protein A im

Überschuß vorinkubiert.

Eine Menge von 5 x 10^6 Zellen inkubierten wir mit je 50 µl der einzelnen Antikörper und Fluoreszenzmarker für je 30 min. unter Lichtabschluß in Eppendorf-Röhrchen.
Für die verwendeten Reagentien erwiesen sich folgende Konzentrationen als geeignet:

sATG unverdünnt: 1 mg/ml. Anti-Ia-Sera: optimale Verdünnung von 1:2. TRITC- und FITC-pA unverdünnt: je 2 mg/ml.

Alle Versuchsschritte fanden bei 4^oC statt.

Der gesamte Ablauf ist in Abb.2 nocheinmal schematisch dargestellt.

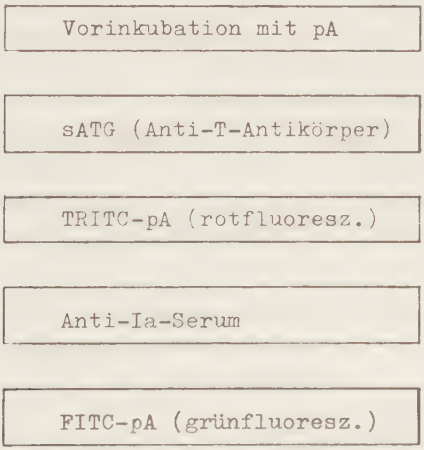

Abb.2: Ausführung der Doppelfluoreszenzmethode schematisch dargestellt.

Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen zweimal in Hanks gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Zellen zentrifugiert und auf einen mit 1 Tropfen Glycerin/Glycin-Gemisch versehenen Objektträger aufgebracht.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden mit der angegebenen Filterkombination (siehe Abschnitt 3.4) je 200 Zellen ausgezählt und die Zahl der roten und der doppeltpositiven Zellen bestimmt.

3.5.2 Dreifachmarkierung (CTX-kombinierte Methode)

Bei diesem Versuchsansatz werden nur Ig-tragende Zellen durch Fluoreszein-konjugiertes Anti-Human-Ig grün markiert. Zur Absättigung dieses Antikörper-IgG wurde anschließend das ebenfalls grün-fluoreszierende FITC-pA zugegeben. Unseren Anti-T-Zell-Antikörper sATG verwendeten wir in Verbindung mit grellrot fluoreszierendem TRITC-pA zur T-Zell-Markierung.
Die so gekennzeichneten T- und B-Zellen setzten wir im zytotxischen Test (CTX) dem entsprechenden Anti-Ia-Serum und Komplement aus. Ethidium-Bromid markierte abgetötete Zellen durch kräftige intrazelluläre Rotfluoreszenz (ziegelrot).

Die Bedingungen der Inkubation sowie Zellmenge, Antikörperkonzentration und Volumen der zugesetzten Agentien entsprachen bei diesem Verfahren den unter 3.5.1 beschriebenen Verhältnissen.

Darüber hinaus verwendeten wir das Fluoreszein-konjugierte Anti-Human-Ig von der Firma Wellcome in einer Verdünnung von 1:16.

Im zytotoxischen Test setzten wir pro Ansatz (5×10^6 Zellen) 50µl Anti-Ia-Serum, 100µl unverdünntes Kaninchenkomplement und 20µl Glycinlösung (5%-ig), im nächsten Inkubationsschritt 50µl Ethidium-Bromid und 10 min. spä-

ter, ohne vorheriges Waschen, 50µl EDTA zu.

Die genaue Ausführung ist in Abb.3 schematisch dargestellt.

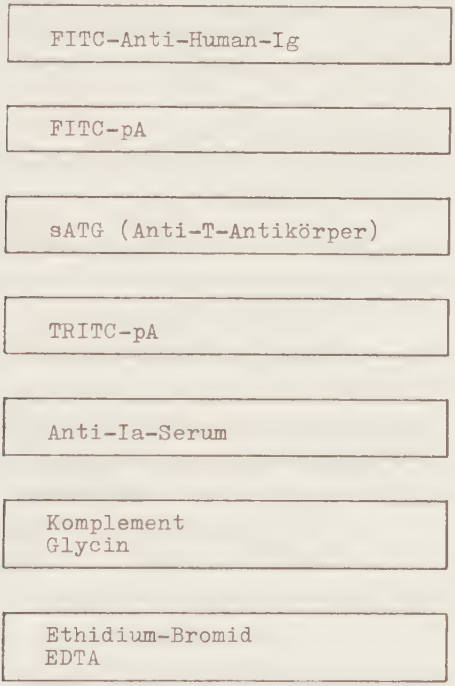

Abb.3: Die bei der Dreifachmarkierung von Lymphozyten verwendeten Einzelschritte (schematische Übersicht).

Bei Testende wurden die gewaschenen und zentrifugierten Zellen auf die mit 1 Tropfen Glycerin/Glycin-Gemisch vorbereiteten Objektträger aufgebracht und die Zahl der FITC/EB- doppeltpositiven Zellen (B-Zellen) sowie die Zahl der EB-markierten Zellen, jeweils bezogen auf 200

ausgezählte Zellen, bestimmt.

Durch EB wurden spezifisch alle Ia-positiven Zellen intrazellulär ziegelrot markiert. Dabei waren die Ia-positiven B-Zellen durch einen scharfen grünen Ring entlang der Zellmembran abgrenzbar von Ia-positiven T-Zellen. Die TRITC-Markierung (schwache ringförmige Rotfluoreszenz der Membran) Ia-positiver T-Zellen wurde nach der Aufnahme von EB ins Zellinnere durch dessen kräftigere Rotfluoreszenz überdeckt, sodaß sie stark rot gefärbt erschienen und von den (Ia-positiven) Makrophagen fluoreszenzoptisch nicht abgrenzbar waren.

Von der Zahl der nur rot-gefärbten Zellen wurde deshalb die zuvor durch Latex-Aufnahme (aktive Phagozytose) bestimmte Zahl der Makrophagen abgezogen.

Ebenfalls abgezogen wurde die Zahl der primär lysierten Zellen (Viability nach Abschluß des Tests zwischen 80 und 95%),da sie unspezifisch an der Aufnahme von EB teilnehmen. Hierbei wurden jedoch nur die lysierten T-Zellen berücksichtigt, berechnet aus Gesamt-T-Zell-Anteil und Viability, da tote B-Zellen durch ihre gleichzeitige FITC-Narkierung schon optisch abgrenzbar waren.

Der Gesamt-T-Zell-Anteil wurde vor Zugabe von EB (und bezogen auf 200 im sichtbaren Licht ausgezählte Zellen) bestimmt. Ein zusätzlicher Anschluß einer Lichtquelle mit sichtbarem Licht und Phasenkontrast am Fluoreszenzmikroskop ermöglichte diese Zählweise.

3.5.3 Weitere und allgemeine Verfahren

Photospektrometrische Proteinbestimmung:
Mit einem Leitz Photospektrometer Typ PMQ II bestimmten wir bei einer Wellenlänge von 280 nm den Proteingehalt einer sATG-Lösung gegen Hanks-Salzlösung als Leerwert in Quarzküvetten. Aus dem Wert für die optische Dichte berechneten wir durch Multiplikation mit dem Faktor 0,8 die Proteinkonzentration.

Zellzählung und Bestimmung der Viability mit Trypan Blau:
Eine Probe der zu untersuchenden Zellsuspension wurde zu gleichen Anteilen mit Trypan Blau gemischt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Tote Zellen nehmen Trypan Blau ins Zellinnere auf. Dadurch läßt sich der prozentuale Anteil der lebenden Zellen (Viability) ermitteln.

Latex-Methode:
Zur Bestimmung eines "kontaminierenden" Makrophagen-Anteils in den einzelnen Lymphozytenpopulationen behandelten wir Zellproben mit einer Suspension von polysteren Latex-Partikeln (Dow Chemicals) nach der Literatur von (52). Man mischt 1 ml der Zellsuspension (4-5 x 10^6 Zellen) mit 1 Tropfen der 1:10 verdünnten Latex-Suspension. Während einer Inkubation von 30 min. bei 37°C im Wasserbad phagozytieren die Makrophagen die Latexpartikel. Anschließend verdünnt und wäscht man die Suspension mit Hanks und zentrifugiert 1 min. bei 500g, bis der Großteil der freien Latexpartikel entfernt ist (4-5 mal). Unter dem Phasenkontrastmikroskop zählt man die Zellen aus, die Latexpartikel phagozytiert haben.

Rosetten-Test:
Dieser Test für Lymphozyten, die mit Hammelerythrozyten spontan Rosetten bilden (T-Zellen), wurde nach Jondal et

al. (27) durchgeführt. Der Prozentsatz an Lymphozyten, die mehr als zwei Erythrozyten gebunden hatten, wurde mittels Neubauer Zählkammer unter dem Phasenkontrast-Mikrskop ermittelt. Jeder Bestimmung legten wir ein Minimum von 200 ausgezählten Zellen zugrunde.

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung und Spezifität des sATG

Um die Frage der Ia-Positivität peripherer T-Lymphozyten klären zu können, wurde zunächst ein spezifischer Antikörper gegen T-Zellen benötigt.

Die Testung eines vermeintlich spezifischen Anti-T-Zell-Serums aus einem auswärtigen Laboratorium ergab das gleichzeitige Vorliegen kontaminierender Antikörper gegen B-Zellen. Die unabdingbare Notwendigkeit einer zuverlässigen T-Zellidentifizierung in gemischten T-/B-Zellpopulationen machte die eigene Herstellung eines mit Sicherheit T-Zell-spezifischen Antikörpers erforderlich.

Zur Antiserumherstellung eigneten sich Kaninchen, wie im Methodikteil beschrieben, mit menschlichen Thymozyten immunisiert.

4.1.1 Antikörperaktivität vor und nach der Absorption

Die Antikörperaktivität wurde jeweils im Kontrastfluoreszenz-Zytotoxizitätstest (KF-CTX-Test) bestimmt (s.S. 16). Als negative Kontrolle diente hitzeinaktiviertes menschliches AB-Serum. Die Viability der Testzellen lag zwischen 90 und 95%.

Die heterologen Anti-Thymozyten-Sera waren primär noch nicht T-Zell-spezifisch. Wie Tab.2 zeigt, wurden bei primären Anti-T-Zell-Titern von 1:1024-1:4096 primäre Anti-B-Zell-Titer von bis zu 1:1024 erreicht.

Nach einer Absorption mit A-, B- und O-Erythrozyten sowie mit drei lymphoblastoiden B-Zell-Linien unterschieden die Antisera deutlich, jedoch noch nicht eindeutig zwischen T- und B-Zellen. So war bei Titern zwischen 1:32-1:128 und 1:512-1024 mit T-Zell-Linien und Thymozy-

ten als Zielzellen eine nur noch geringe Restaktivität gegen B-Zell-Linien nachweisbar. Ein relativ hoher Titer von 1:32 fand sich noch gegen die B-Zell-Linie RPMI - Nc 37; RPMI-8866 und -1788 wurden hingegen nur noch durch die unverdünnten Sera zu einem geringen Prozentsatz abgetötet.

Tab.2: Antikörpertiter der nicht absorbierten und der ABO-Erythrozyten- sowie B-Zell-Linien-absorbierten Seren gegen verschiedene B-Zell-Linien, T-Zell-Linien und Thymozyten im Kontrastfluoreszenz-Zytotoxizitätstest.

Zielzellen[a]	KF-CTX-Titer[b] von:					
	nicht absorb. Serum			absorb. Serum[d]		
	Nr.1	Nr.2	Nr.3	Nr.1	Nr.2	Nr.3
Thymozyten						
"Thy_H"	1: 4096	4096	4096	1: 512-1024	512-1024	512-1024
T-Zell-Linien						
"Molt 4"	1: 2048	2048	4096	1: 64	32	64
"Jurkat"	1: 2048	1024	2048	1: 64-128	64-128	64-128
B-Zell-Linien						
"RPMI-1788"	1: 256	256	256	neg.	neg.	neg.[c]
"RPMI-8866"	1: 512	256	1024	neg.	neg.	neg.
"RPMI-Nc37"	1: 1024	1024	1024	1: 32	32	32

[a] Zellkonzentration: 3 x 10^3/µl

[b] Antikörperverdünnung, bei der 50% der Zellen lysiert waren

[c] negativ

[d] Absorption mit ABO-Erythrozyten und je 2 x 10^8 Zellen pro Zell-Linie und ml Serum.

Alle drei hergestellten Antisera lieferten vergleichbare Ergebnisse, so daß wir uns im Folgenden auf die Verwendung eines Serums (Serum 1) beschränken konnten.

Mit dem Serum 1 wurde eine zusätzliche B-Zell-Linien-Absorption durchgeführt. Wie in Abb.4 dargestellt, fand sich daraufhin gegen keine der drei B-Zell-Linien mehr eine zytotoxische Aktivität. Die Anti-T-Zell-Titer des Serums erreichten weiterhin hohe Werte von 1:32 und 1:64 mit den T-Zell-Linien Jurkat und Molt 4, 1:256 mit einer aus Tonsillen isolierten T-Zelle und Werte von 1:256 und 1:1024 mit den Thymozyten Thy_{MM} und Thy_{SB}.

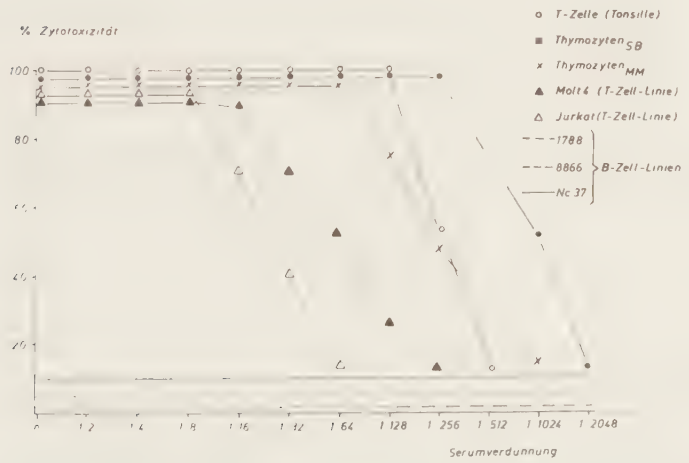

Abb.4: Komplementabhängige Zytotoxizität des Serums 1 nach wiederholter B-Zell-Linien-Absorption. Das Serum reagiert im Kontrastfluoreszenz-Zytotxizitätstest mit verschiedenen Thymozyten, T-Zell-Linien und einer aus Tonsillen isolierten T-Zelle. B-Zell-Linien werden nicht

erkannt. Die eingezeichneten Kurvenpunkte stellen den jeweiligen Mittelwert von 6 Einzelmessungen dar.

Die isolierte Gammaglobulinfraktion von Serum 1 wurde im HLA-Screening[1] getestet. Es zeigten sich in der Tat positive Reaktionen mit mehreren HLA-Spezifitäten des Screening-Panels. Exemplarisch dafür stehen in der Abb.5 die Spezifitäten "An" und "We" mit Reaktionen von über 85% bis zu 100% Zytotoxizität.

Nach der daraufhin durchgeführten Absorption des Antikörpers mit einem Pool menschlicher Blutplättchen wurde bei keiner der zahlreichen Spezifitäten des Screening-Panels mehr ein zytotoxischer Wert von 75% überschritten. Dieser Wert entspricht dem maximalen Prozentsatz an T-Zellen in den einzelnen Lymphozytenpopulationen (periphere Blutlymphozyten) des Panels.

Die Testzelle "Pro" mit einem zytotoxischen Wert um 80% kann als Beispiel für die HLA-Typen angesehen werden, gegen die primär kaum Aktivitäten vorhanden waren.

Um die Beteiligung von Anti-B-Zell-Aktivitäten auszuschließen, wurde das Screening-Programm mit CLL-Zellen erweitert, die von verschiedenen Patienten mit verschiedenen HLA-Typen stammten. Nur gegen eine der CLL-Zellen (CLL-Wa in Abb.5) besaß der Antikörper zytotoxische Aktivität, die jedoch nicht B-Zell-spezifisch, sondern gegen den speziellen HLA-Typ gerichtet war, wie sich am Verschwinden der Aktivität nach der Plättchenabsorption

[1] Zytotoxischer Suchtest auf HLA-Alloantikörper im Serum mit Eosin als positivem Farbstoffindikator.
Dieser Test wurde vom Gewebetypisierungslabor unserer Arbeitsgruppe in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

zeigte.

CLL-Re steht als Beispiel für alle anderen CLL-Zellen des Panels, die serologisch nicht erkannt wurden.

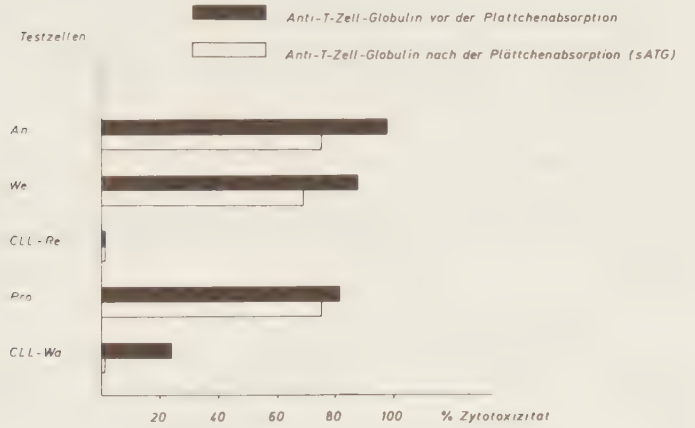

Abb.5: Ergebnisse des HLA- und CLL-Zell-Screenings am Gammaglobulin von Serum 1, jeweils vor und nach der Plättchenabsorption, exemplarisch dargestellt an 3 Normallymphozyten "An", "We" und "Pro" (durchschnittlicher T-Zell-Anteil 70-75%) sowie an 2 CLL-Zellen (vom B-Zell-Typ) "CLL-Re" und "CLL-Wa" aus dem Screening-Panel.

Man erkennt, daß das Serum vor der Plättchenabsorption noch HLA-Antikörper enthält und deshalb auch mit B-Zellen reagiert. Nach der Absorption sind keine unspezifischen Antikörper gegen HLA-Antigene mehr vorhanden. Das Serum reagiert nur mit einem bestimmten Prozentsatz der Zellen, der dem T-Zell-Anteil entspricht.

4.1.2 Vergleichende Charakterisierung von Lymphozytenpopulationen mit sATG und anderen Markern.

Die zytotoxische Aktivität des Plättchen-absorbierten Anti-T-Zell-Globulins (sATG) gegen die in den folgenden Untersuchungen als Zielzellen verwendeten Lymphozytenpopulationen von zwei gesunden Spendern "Ves 6" und "Mau" sowie zwei Tonsillen und einem CLL- Patienten ist in Abb.6 dargestellt. Ein Plateau der zytotoxischen Reaktion macht es möglich, den prozentualen T-Zell-Anteil in den verschiedenen Populationen zu bestimmen.

In einer Verdünnung von 1:2 wurden 82% Ves 6, 70% Mau, 68% Tons.$_{I}$ und 58% Tons.$_{II}$ abgetötet. Der Wert mit CLL-632 lag mit 1-5% toten Zellen im Bereich der negativen Kontrolle.

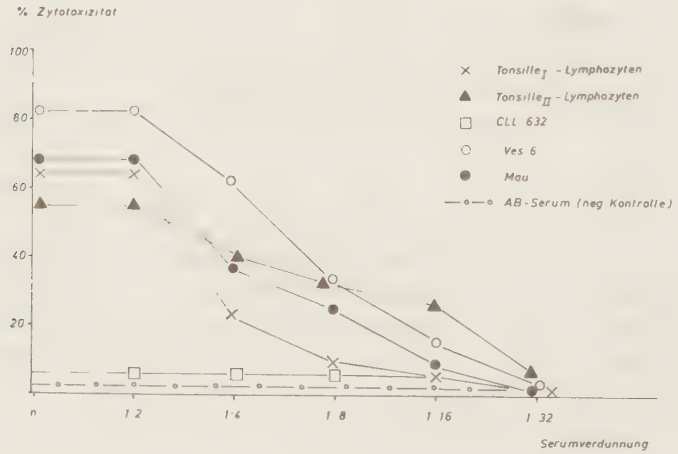

Abb.6: Komplementabhängige Zytotoxizität des Plättchen-absorbierten sATG gegen verschiedene Lymphozytenpopulationen im Kontrastfluoreszenz-Zytotoxizitätstest.

Der Prozentsatz sATG-reaktiver Lymphozyten in den untersuchten Lymphozytenpopulationen korrelierte mit dem Anteil der mit Hammelerythrozyten Rosetten bildenden Zellen, kontrastierte jedoch mit der Zahl der Zellen, die durch Anti-C_4- bzw. Anti-Ia-Serum abgetötet wurden. Die Ergebnisse sind im Einzelnen in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab.3: Vergleichende Charakterisierung verschiedener Lymphozytenpopulationen mit sATG und Rosettentest als T-Zell-Markern und einem spezifischen Anti-C_4-Serum als B-Zell-Marker sowie mit dem breitreaktiven heterologen Anti-Ia-Serum 002.

Lymphozyten	(Viab.)[a]	% Zytotoxizität[b] im KF-CTX-Test mit:			HE-Rosetten (%)
		sATG	Anti-Ia	Anti-C_4	
Ves 6	92%	82	18	15	63
Mau	95%	70	28	24	53
$Tons._I$	90%	68	32	30	50
$Tons._{II}$	95%	58	45	42	41
CLL-632	95%	1-5[d]	98-100	98	n.d.[c]

[a] vor dem Test mit Trypan Blau bestimmt

[b] Zytotoxizität im Bereich mehrerer Verdünnungsstufen des Antikörpers (Plateau). Die angegebenen %-Werte entsprechen arithmetischen Mittelwerten aus 6 nach der N.I.H.-Technik mit Bewertungen von 1-8 durchgeführten Bestimmungen.

[c] nicht durchgeführt

[d] im Bereich der negativen Kontrolle

4.2 Beobachtungen an Einzelabsorptionen

Proben des Anti-Thymozyten-Serums 1 wurden, ABO-Erythrozyten-absorbiert, der Absorption mit je einem weiteren Antigen, T- oder B-Zelle, unterzogen und die verbleibende Aktivität gegen T- und B-Zellen im Kontrastfluoreszenz-CTX-Test untersucht. Abb.7 zeigt die Effekte der einzelnen T- und B-Zell-Absorptionen auf die Aktivität des AntiKörpers gegen B-Zell-Linien. Die anfänglich ho-

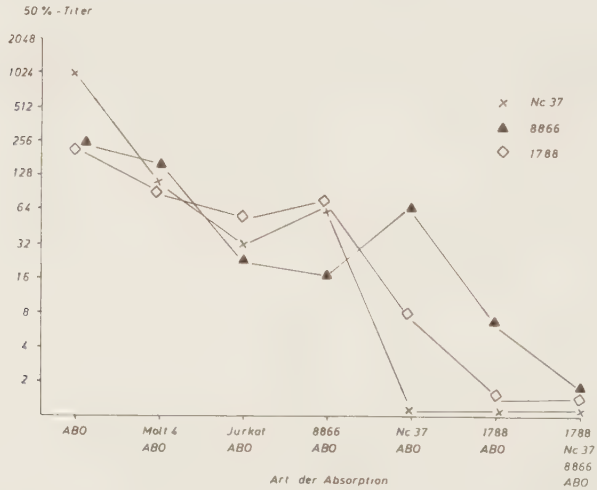

Abb.7: Titerprofile des Serums 1 gegen die B-Zell-Linien Nc 37 (x——x), 8866 (▲——▲) und 1788 (◇——◇) in Abhängigkeit vom Absorptionszustand des Serums. Es wurde mit je 2 x 10^8 Zellen/ml Serum absorbiert.

hen Titer von 1:256-1024 des nur ABO-Erythrozyten-absorbierten Serums gegen die einzelnen B-Zell-Linien wurden durch die Absorption mit der T-Zell-Linie "Molt 4" auf Werte um 1:128, durch "Jurkat", ebenfalls eine T-Zell-Linie, auf 1:32-64 gesenkt. Mit Ausnahme der "RPMI-8866"-Absorption, nach der noch ein Titer von 1:16 gegen diese Zielzelle bestehen blieb, verschwand jede primär vorhandene Aktivität gegen die jeweils in der Absorption eingesetzte B-Zell-Linie vollständig. Die Absorption mit allen drei Zell-Linien hintereinander beseitigte jede B-Zell-spezifische Restaktivität, auch die gegen "RPMI-8866" gerichtete.

Die Effektivität der vorgenommenen B- bzw. T-Zell-Linien-Absorptionen im Hinblick auf die Spezifität sowie die Aktivität des Antikörpers gegen zwei verschiedene T-Zell-Linien und Thymozyten sind in Abb.8 dargestellt. Es zeigte sich dabei, daß eine Absorption mit "Molt 4", die ausreichte, den Titer gegen diese Zelle von 1:1024 auf 1:4 herabzusetzen, eine nur geringe Titerabnahme von 1:2048 auf 1:128-256 gegen Thymozyten bewirkte. Ein entsprechend gutes Ergebnis war bei einer Absorption mit "Jurkat" festzustellen, die zwar den Antikörpertiter gegen "Jurkat" selbst um 8 Titerstufen auf 1:2 herabsetzte, jedoch den Titer gegen Thymozyten nur um 3 Titerstufen, nämlich von 1:2048 auf 1:256. Die beiden T-Zell-Linien verringerten die Aktivität des spezifischen Antikörpers wechselseitig um 3 Titerstufen.

Durch die B-Zell-Linien-Absorption mit "RPMI-8866" wurde auch die Anti-T-Zell-Aktivität um durchschnittlich 2-3, mit "RPMI-Nc 37" um 3-4 Titerstufen erniedrigt. Die "RPMI-1788"-Absorption konnte für den Titer gegen Thymozyten nur mit einer Abnahme von 2 $^{1}/2$ Titerstufen auf 1:256-512 erkauft werden. Die beiden anderen Titer gegen

"Jurkat" und "Molt 4" verhielten sich wie nach der "RPMI-Nc 37"-Absorption.

Es zeigte sich außerdem, daß eine Absorption mit einem Gemisch der drei B-Zell-Linien[1] die Anti-T-Zell-Aktivität des Antikörpers nur wenig stärker beeinflußte, als es vergleichsweise die Absorption mit einzelnen B-Zell-Linien bewirkte.

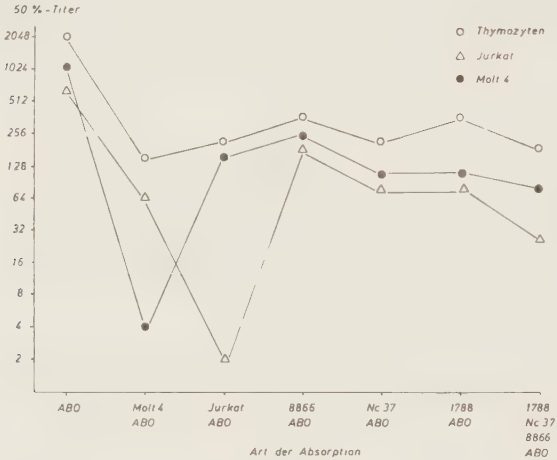

Abb.8: Titerprofile des Serums 1 gegen die T-Zell-Linien Molt 4 (●——●) und Jurkat (Δ——Δ) sowie Thymozyten (○——○) in Abhängigkeit vom Absorptionszustand des Serums. (Absorption mit je 2 x 10^8 Zellen/ml Serum).
Die Verbindungsstriche dienen lediglich einer besseren Anschaulichkeit des Serumtiterverhaltens gegen die drei konstant verwendeten Zielzellen.

[1] ein technisch für die Volumenausbeute günstigerer Ansatz

4.3 Ia-positive T-Zellen

Die Untersuchung von Normallymphozyten des peripheren Blutes und der Tonsillen mit 1) einem Verfahren der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung und 2) einem mit dem zytotoxischen Test kombinierten Verfahren (Dreifachmarkierung) erbrachte folgende Ergebnisse:

Normale Lymphozytenpopulationen aus peripherem Blut und Tonsillen enthalten zu einem kleinen Prozentsatz, der zwischen 2% und 6% liegt, Zellen, die sowohl mit Anti-T-Zell-spezifischem sATG als auch mit spezifischen Anti-Ia-Sera reagieren und zwar gleichermaßen in der Immunfluoreszenz wie in der Zytotoxizität. (Siehe hierzu 4.3.1 und 4.3.2)

Die im folgenden angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte, denen Doppelbestimmungen an jeweils 200 ausgezählten Zellen zugrunde liegen.

Die Zahl kontaminierender Makrophagen, die als Träger von Ia-Determinanten bei der IF-Doppelmarkierung in die Zahl der FITC-markierten Zellen, beim CTX-kombinierten Verfahren in die Zahl der Ethidium-Bromid-markierten Zellen mit eingeht, wurde vor dem Test mit Latexpartikeln bestimmt. Diese Werte wurden bei der Auswertung berücksichtigt und vom Endwert abgezogen.

4.3.1 Tab.4: Ergebnisse mit der IF-Doppelmarkierung:

Testzelle "Ves 6", Viability 92% (vor dem Test bestimmt) (peripheres Venenblut)

Anti-Ia, FITC-pA grün		sATG, TRITC-pA rot	Doppelmarkierung grün/rot
23%		75%	2%
21% B	2% Makr.	T (Ia-neg.)	Ia-pos. T

Testzelle "Mau", Viability 95% (peripheres Venenblut)

Anti-Ia,FITC-pA grün		sATG,TRITC-pA rot	Doppelmarkierung grün/rot
24%		70%	60%
23% B	1-2%Makr.	T (Ia-neg.)	Ia-pos. T

Testzelle "Tons.I", Viability 90% (Tonsille)

Anti-Ia,FITC-pA grün		sATG,TRITC-pA rot	Doppelmarkierung grün/rot
32%		65%	3%
28% B	4% Makr.	T (Ia-neg.)	Ia-pos. T

Testzelle "Tons.II", Viability 95% (Tonsille)

Anti-Ia,FITC-pA grün		sATG,TRITC-pA rot	Doppelmarkierung grün/rot
42%		54%	4%
39% B	3-4%Makr.	T (Ia-neg.)	Ia-pos. T

Testzelle "CLL 632", Viability 95% (Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ)

Anti-Ia,FITC-pA grün		sATG,TRITC-pA rot	Doppelmarkierung grün/rot
98%-99%		1%-2%	-
93% B	5% Makr.	T (Ia-neg.)	Ia-pos. T

4.3.2 Ergebnisse aus der Dreifachmarkierung

Wie schon im Methodikteil beschrieben, wurden bei diesem von uns neu entwickelten Verfahren zuerst B-Zellen und T-Zellen immunfluoreszenzfärberisch markiert (B-Zellen durch FITC-konjugiertes Anti-Human Ig sowie FITC-pA grün-, T-Zellen durch sATG zusammen mit TRITC-pA rotfluoreszierend). Die hierauf bestimmte Zahl der TRITC-markierten Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl ist für die einzelnen Lymphozytenpopulationen in Tab.5 angegeben. (Gesamtzellzahl aus FITC-markierten und TRITC-markierten Zellen sowie aus den noch unmarkierten, nur im sichtbaren Licht erfaßbaren, kontaminierenden Makrophagen).

Nach zytotoxischer Behandlung mit Anti-Ia und Komplement und nachfolgender Markierung der Zellen durch EB waren unter dem Fluoreszenzmikroskop mit spezieller Filterkombination folgende Zellgruppen zu unterscheiden:

I. FITC/EB - doppeltpositive Zellen = B-Zellen[1]

II. EB - positive Zellen.

Es stellte sich heraus, daß die stärkere (ziegelrote) Fluoreszenz des EB die schwächere Rotfärbung des TRITC überdeckt, sodaß eine TRITC/EB-Doppeltpositivität optisch nicht darstellbar war. Es nahm jedoch die zuerst bestimmte Zahl der TRITC-markierten Zellen nach Inkubation mit Anti-Ia zugunsten EB-gefärbter Zellen zu einem bestimmten Prozentsatz ab.

Die weitere Differenzierung dieser Gruppe EB-positiver Zellen erfolgte bei der Auswertung durch:

[1] ziegelrote Fluoreszenz der Zelle mit grünfluoreszierender "Cap"-Formation der Membran.
Diese Gruppe beinhaltet auch B-Zellen, die primär lysiert waren.

1.) Abzug der Makrophagen, die wegen ihrer Ia-Positivität durch EB erfaßt wurden,
2.) Abzug primär lysierter T-Zellen[1], die unspezifisch EB aufnehmen.

Es blieb in allen untersuchten Lymphozytenpopulationen mit Ausnahme der CLL-Zellen eine Restpopulation zwischen 3 und 6% EB-gefärbter Zellen, also von B-Zellen unterscheidbare, Ia-positive Lymphozyten.
Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

[1] berechnet aus "Viability" und der Gesamtzahl (TRITC-markierter) T-Zellen in %.

Tab.5: Ergebnisse der CTX-kombinierten Methode

Zellen	Mikroskopisches Bild			Makrophagen[c]	primär[d] lysierte T-Zellen	Ia-pos.T-Zellen[e]
	B	T				
	FITC-/grün/EB-rot %	TRITC-rot %	EB-rot[b] %	%	%	%
Ves 6	19-20	78/65[a]	15	2	10	3
Mau	26	76/64	14	1-2	6	5-6
Tons.$_{I}$	30	67/41	30	4	22	4
Tons.$_{II}$	39	58/42	19	3-4	12	3-4
CLL-632	92	0-1	5-6	5	-	-

[a] vor und nach der zytotoxischen Behandlung mit Anti-Ia und Komplement und der EB-Markierung ausgezählt

[b] kräftige Rotfluoreszenz, farblich unterscheidbar von der TRITC-Rotfluoreszenz, überdeckt diese jedoch im Falle einer Doppeltpositivität. Heterogene Zellgruppe aus Makropha en, primär lysierten T-Zellen und Ia-positiven T-Zellen

[c] vor dem Test mit Latex bestimmt

[d] aus Viability und Gesamtzahl der (TRITC-markierten) T-Zellen berechnet

[e] berechnet wie im Text beschrieben

Die Viability der Zellen wurde nach dem Test an der negativen Kontrolle bestimmt und betrug:
87% bei Ves 6, 92% bei Mau, 68% bei Tons.$_{I}$, 79% bei Tons.$_{II}$ und 90% bei CLL-632.

5 DISKUSSION

5.1 Problemkreis

Die Zellmembranmarker vom Typ der Ia-Alloantigene (HLA-DR) haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Diese HLA-DR-Region-abhängigen Antigene stellen nicht nur eine Erweiterung der Phänotypisierung von Lymphozytenoberflächen im Rahmen der Histokompatibilitäts-Forschung dar (55), sondern spielen auch für die Vorgänge der T-/B-Zell-Interaktion in der Immunregulation eine wesentliche Rolle (37), (9).

In diesem Zusammenhang ist ihre unterschiedliche Ausprägung auf bestimmten Subpopulationen der Lymphozyten von großem Interesse. Ia-Determinanten sind nicht nur auf B-Zellen oder Makrophagen, sondern wie neuere Untersuchungen am analogen Histokompatibilitätssystem (H-2) bei der Maus schon zeigten, auch auf Subpopulationen von T-Zellen nachweisbar (15),(16),(18),(19). Diese Ia-positiven T-Zell-Subpopulationen schließen die funktionelle Gruppe der Suppressor-T-Zellen ein (53), wie sie unter bestimmten Bedingungen (Hyperimmunisierung von Ratten) beschrieben wurden (36),(47). Ebenso wurden auf den die Immunantwort in verstärkendem Sinne regulierenden Helfer-T-Zellen bestimmte I-Region-abhängige Antigene gefunden (37). Die selektive Expression von I-Region-abhängigen Determinanten auf den Zellen, die direkt wie die B-Zellen (als Vorstufen der Antikörper produzierenden Plasmazellen) und indirekt wie die immunregulativen T-Zell-Subgruppen an der Antikörperbildung beteiligt sind, scheint ein wesentlicher Regulationsmechanismus der Immunantwort zu sein (37).

Da mit dem Vorkommen von Ia-Antigenen in den einzelnen

B- und T-Zellklassen bzw. T-Zell-Subklassen eine funktionelle Heterogenität verbunden ist, lassen sich die Ia-Determinanten als Zelldifferenzierungsmarker verwenden (60).

Lange Zeit bestanden kontroverse Meinungen zu der Frage, ob auch beim Menschen Ia-positive T-Zell-Subpopulationen nachweisbar sind (nach Kerbel (28)). Wernet et al. (60) konnten zeigen, daß sich in MLC-stimulierten Lymphozytenpopulationen des Menschen Ia-Alloantigen-positive T-Zell-Subgruppen finden. Aus derselben Untersuchung geht hervor, daß diese Ia-Expression auf bestimmten T-Zellen auch beim Menschen mit der Immunregulation, hier im Sinne einer Suppression zusammenhängt: durch Behandlung mit Anti-Ia-Serum und Komplement konnte die Funktion allogener Suppressor-T-Zellen gehemmt werden.

Über welchen Mechanismus die Ia-Antigene bei der Immunregulation eine Rolle spielen, ist noch nicht bekannt. Betrachtet man die verschiedenen Funktionen von Ia-positiven Zellen, erscheint es wahrscheinlich, daß diese Determinanten an mehr als einer Rolle beteiligt sind (nach Wernet et al. (60)). Diese Vermutung wird weiter unterstützt durch Ergebnisse von Okumura et al. (37) bei der Maus: es gibt bestimmte, Suppressor-T-Zellen kennzeichnende Ia-Determinanten, die durch einen konkreten Genort (Ia-4) der IJ-Region im H-2 Komplex kontrolliert werden. Diese unterscheiden sich von den Determinanten der Helfer-T-Zellen und den bisher bekannten Ia-Spezifitäten der B-Zellen. Dies stellt eine Besonderheit dar, weil andere I-Region-abhängige Determinanten auf T-Zell-Subgruppen mit den auf B-Zellen gefundenen Ia-Spezifitäten identisch sind (9).

Wir verwendeten in unseren Studien im Falle der Tonsillenlymphozyten ein breitreaktives heterologisches Anti-

Ia-Serum, für die beiden Lymphozytenpopulationen aus dem peripheren Blut zwei homologe Anti-Ia-Seren mit den entsprechenden Spezifitäten (Anti-DRW-2 bzw. Anti-DRW-3).

In allen Fällen erkannten diese Antisera sowohl B-Lymphozyten als auch, zu einem Prozentsatz von 2% - 6%, T-Lymphozyten. Aufgrund dieser Tatsache kann, im Zusammenhang mit den oben erwähnten Befunden bei der Maus, geschlossen werden, daß diese gegen menschliche HLA-DR-Alloantigene gerichteten Anti-Ia-Seren solche Ia-Antigen-verwandten Determinanten einer T-Zell-Subpopulation erkannten, die denen der B-Zellen entsprachen. Ob darüberhinaus mit dem breitreaktiven, heterologen Anti-Ia-Serum auch solche Ia-Determinanten erkannt wurden, die ausschließlich auf Suppressor-T-Zellen vorkommen (analog den Ia-4 abhängigen Determinanten der Maus), kann durch die vorliegenden Untersuchungen allein nicht entschieden werden. Ebenso kann im Rahmen dieser Untersuchung keine Aussage darüber gemacht werden, ob die von uns nachgewiesenen Ia-positiven T-Zell-Subgruppen als Helfer- oder Suppressor-T-Zellen anzusehen sind. Es konnte jedoch in den schon erwähnten Experimenten mit MLC-stimulierten Lymphozytenpopulationen (60) gezeigt werden, daß homologe Anti-Ia-Sera mit einer dem HLA-D-Typ des betreffenden Spenders assoziierten Spezifität, wie wir sie in der vorliegenden Arbeit verwendeten, allogene Suppressor-T-Zellen erkennen.

Ohne eine vorherige experimentelle Stimulation der Zellen, sei es im MLC-Test, durch Mitogene wie Con A oder Hyperimmunisierung von Tieren, wurden bisher weder beim Menschen noch irgend einem Tiermodell, mit Ausnahme der Maus (15),(16), (18), Differenzierungsmarker vom Ia-Typ auf T-Zellen nachgewiesen. Dies führte zu der Annahme, daß T-Lymphozyten sich erst nach einer solchen Antigen- oder Mitogen-Exposition zu den für die Immunregulation

verantwortlichen funktionellen T-Zell-Subgruppen differenzieren, die dann durch Differenzierungsmarker wie die Ia-Antigene (oder auch bestimmte Ly-Determinanten der Maus (8)) gekennzeichnet sind (9).

Wir verwendeten in unseren Studien Lymphozytenpopulationen, die nicht zuvor experimentell stimuliert worden waren. Wenn auch speziell bei den Tonsillenlymphozyten als Operations-Präparaten eine in-vivo Stimulation des immunregulativen Systems im Rahmen eines chronischen oder akuten Infektes nicht ausgeschlossen werden soll, spricht der Nachweis Ia-Alloantigen-positiver T-Zell-Subgruppen in den Lymphozytenpopulationen des peripheren Blutes von gesunden Spendern eher für eine Antigen-unabhängige funktionelle Heterogenität peripherer T-Lymphozyten.

Diese Interpretation wird gestützt durch Ergebnisse von Cantor & Boyse (8), die anhand eines anderen Systems von Differenzierungs-Antigenen, den Ly-Determinanten, bei der Maus zeigen konnten, daß die Entwicklung funktionell distinkter T-Zell-Subklassen ein Antigen-unabhängiger Differenzierungsprozeß ist. Die hier dargelegten Untersuchungsergebnisse stellen in diesem Zusammenhang einen neuen Anstoß für das Studium der Differenzierung und Funktion der immunregulativen T-Zell-Subgruppen beim Menschen dar.

5.2 Verfahren zum Nachweis Ia-positiver T-Zellen

Methodisch wurden in der vorliegenden Arbeit für den Nachweis von T-Lymphozyten zwei verschiedene Wege beschritten: einmal die Doppelimmunfluoreszenz mit Grün- bzw. Rotfärbung, zum andern eine Kombination der Doppelfluoreszenz mit der direkten Antikörper-vermittelten Zytotoxizität (Dreifachmarkierung).

Das Verfahren der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung zum simultanen Nachweis von zwei verschiedenen Antigenen auf der T-Zell-Oberfläche entsprach zunächst der von v.Rood (41) beschriebenen Zwei-Farben-Fluoreszenz zum Nachweis zweier verschiedener Determinanten auf einer B-Zell-Oberfläche. Als Novum wurde in dieser Arbeit die Verwendung von FITC- bzw. TRITC-konjugiertem Protein A zur Doppelmarkierung zweier verschiedener Antigen-Antikörper-Reaktionen auf ein und derselben T-Zelloberfläche entwickelt. Fluorochrom-konjugiertes Protein A stellt eine einfache und stabile Markierungsmöglichkeit dar (13), die eine Verwendung des intakten Antikörpermoleküls im Experiment erlaubt und die zeitaufwendige Methode der Herstellung von Antikörperfragmenten ($F(ab')_2$-Fraktionierung) erübrigt.

Einer falsch positiven Markierung durch Bindung des Protein A an zellständiges Immunglobulin (nach Dorval et al. (13) ist diese Bindung vergleichsweise gering) wurde durch Vorinkubation der Zellen mit freiem Protein A erfolgreich vorgebeugt: an der ebenso vorinkubierten negativen Kontrolle zeigte sich keinerlei Fluoreszenz.

In dem zweiten, mit der Zytotoxizität kombinierten Verfahren (Dreifachmarkierung) wurden Zellen mit Ia-Determinanten, nach vorheriger Identifizierung von T- und B-Zellen mit sATG und Anti-Human-Ig in der Immunfluoreszenz,

durch spezifische Lyse der Zellen erfaßt. Die zytotoxische Wirkung von Anti-Ia und Komplement wurde dabei durch Aufnahme von Ethidium-Bromid in die lysierten Zellen kenntlich gemacht.

Mit beiden Verfahren konnte die Expression von Ia-Alloantigenen auf einer Subpopulation von T-Zellen nachgewiesen werden. Es ergaben sich gut übereinstimmende Werte von 2 bzw. 3% Ia-positiver T-Zellen bei Ves 6, 6 bzw. 5-6% bei Mau, 3 bzw. 4% bei $Tons._{I}$ und 4 bzw. 3-4% bei $Tons._{II}$. Die CLL-Population CLL-"632" zeigte erwartungsgemäß in beiden Fällen keine positiven Ergebnisse.

Die Vorteile des rein immunfluoreszenztechnischen Nachweisverfahrens gegenüber dem zytotoxisch kombinierten Verfahren, wie wir es hier beschreiben, liegen in den folgenden Punkten:

1 Es besteht die Möglichkeit des simultanen Nachweises von Ia- und T-Zell-spezifischen Markern auf einer Zelle durch Doppelmarkierung.

2 Das Verfahren ist kürzer, da wesentlich weniger Inkubationsschritte auszuführen sind. Die daher ebenfalls geringere Zahl an Waschvorgängen zwischen den einzelnen Inkubationen führt zu einer besseren Farbintensität.

3 Kontaminierende (Ia-positive) Makrophagen sind in diesem Verfahren in gleicher Weise wie die B-Zellen von T-Zellen optisch zu unterscheiden. Eine quantitative Bestimmung der Makrophagen mit Latex ist daher nicht erforderlich.

4 Die Viability der Zellen hat keinen Einfluß auf das Ergebnis im mikroskopischen Bild, da keine Farb-Marker wie Ethidium-Bromid verwendet werden, das unspezifisch alle lysierten Zellen anfärbt.

Die Vorteile der zytotxisch kombinierten Methode liegen andererseits darin, daß gezeigt werden kann, daß die Ia-Determinanten nicht passiv angelagerte Moleküle sind, sondern daß die Behandlung der Ia-positiven T-Zellen mit Anti-Ia und Komplement genauso wie bei den B-Zellen zur Zytotxizität führt.

5.3 Die Spezifität des Anti-T-Zell-Globulins

Das sATG wurde in unseren Untersuchungen als spezifischer T-Zell-Marker verwendet. Die vorliegende Arbeit beschreibt Immunisierung und Absorptionsprozeß, die zu dem heterologen, spezifischen Anti-T-Zell-Antikörper (sATG) führten.

Wir absorbierten, um Kreuzreaktionen mit anderen als T-Zell-spezifischen Antigenen zu beseitigen, mit A-, B- und O-Erythrozyten, mit drei lymphoblastoiden B-Zell-Linien und schließlich, nachdem sich in einem HLA-Screening die Notwendigkeit dazu zeigte, mit einem Pool menschlicher Blutplättchen verschiedener HLA-Spezifitäten.

Die Untersuchung des Antikörpers im Kontrastfluoreszenz-Zytotoxizitätstest ergab eine spezifische Aktivität gegen Thymozyten sowie gegen die T-Zell-Linien "Molt 4" und "Jurkat" und einer aus Tonsillen isolierten T-Zell-Population. Konsequent reagierte das sATG nicht mit B-Zellpopulationen, B-Zell-Linien oder CLL-Zellen vom B-Zell-Typ.

Im HLA-Screening wurden etwaige Restaktivitäten gegen HLA-Antigene ausgeschlossen.

Es darf daher davon ausgegangen werden, daß dieses absorbierte sATG ein oder mehrere Antigene erkennt, die lediglich Thymus-abhängigen Lymphozyten gemeinsam sind (T-Zell-spezifische Antigene (39)).

Auffällig war eine in allen Experimenten bestätigte höhere Aktivität des Antikörpers gegen Thymozyten als gegen T-Zell-Linien oder eine aus Tonsillen isolierte T-Zelle. Dies wurde durch zwei verschiedene Experimente erhärtet. Neben klassischen Titrationskurven hatte selbst eine an dem sATG des Antiserums durchgeführte T-Zell-Linien-Absorption einen nur gering schwächenden Effekt auf dessen Anti-Thymozyten-Aktivität. Da die Immunisierung mit Thymozyten erfolgt war, bestätigen diese Befunde auch Ergebnisse von Koshiba et al., wonach die Differenzierung von Thymozyten in periphere T-Lymphozyten mit einer Reduktion bestimmter Thymozyten-spezifischer Antigene (und einem gleichzeitigen Gewinn an peripheren T-Zell-Antigenen) verbunden ist (30).

Die Spezifität des hier hergestellten sATG ermöglichte es, in einer Verdünnungsreihe im KF-CTX-Test den Antikörper zu einem Plateau zu titrieren und damit den Prozentsatz an T-Zellen in verschiedenen gemischten Lymphozytenpopulationen zu bestimmen. Dabei bedingte ein durch die Plattenabsorption eingetretener relativ starker Verdünnungseffekt des Antikörpers eine Reduktion der noch optimalen Antikörperaktivität auf die Verdünnung von 1:2 .

Das sATG erkannte 82% bzw. 70% der peripheren Blutlymphozyten der gesunden Spender Ves 6 und Mau sowie 68% und 58% der Lymphozyten zweier Tonsillen. Ein geringer Unterschied zwischen diesen im KF-CTX-Test bestimmten Werten und den in den beiden Verfahren zum Nachweis Ia-positiver T-Zellen immunfluoreszenztechnisch ermittelten T-Zell-Prozentsätzen (es ergaben sich hier Werte von 77%/78% bei Ves 6, 76% bei Mau, 67%/68% bei $Tons._{I}$ und 58% bei $Tons._{II}$) kann sehr wahrscheinlich auf die unterschiedliche Methode der Auswertung zurückgeführt werden.

Während die immunfluoreszenzfärberisch markierten T-Zellen auf dem Objektträger ausgezählt wurden, handelt es sich beim KF-CTX-Test (ausgeführt in Terasaki-Platten) um ein semiquantitatives Beurteilungssystem. Der Prozentsatz toter Zellen wird dabei abgeschätzt und nach der Standard N.I.H.-Technik mit Zahlen von 1 - 8 bewertet.

In KF-CTX-Tests mit gemischten T-/B-Zell-Populationen zeigte das sATG entgegengesetzte Zytotxizität zu den im Zusammenhang als B-Zell-Marker verwendeten Anti-C_4- und Anti-Ia-Antikörpern. Eine gute Korrelation zeigte sich im Vergleich mit dem Rosettentest (Spontanrosettenbildung mit Hammelerythrozyten), wobei jedoch der Rosettentest stets geringere Werte anzeigte als das sATG. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen von Rodt et al. (40), nach denen die Rosettenmethode einem spezifischen Anti-T-Zell-Globulin als T-Zell-Marker in bestimmten Fällen quantitativ unterlegen ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis der Ia(HLA-DR)-Alloantigene von T-Zell-Subklassen konnte in Lymphozytenpopulationen des peripheren Blutes und der Tonsillen erbracht werden.

Mit speziellen Methoden der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung via Protein A, wie hier zum erstenmal für T-Zellen beschrieben, wurden Ia-Alloantigene und T-Zell-spezifische Marker durch Grün- bzw. Rotfluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer speziellen Filterkombination simultan auf ein und derselben T-Zell-Oberfläche sichtbar gemacht.

In einem zweiten, mit der Zytotoxizität kombinierten Verfahren (Dreifachmarkierung) wurden zunächst B- und T-Zellen immunfluoreszenzoptisch identifiziert, quantifiziert und anschließend die Zahl der durch Inkubation mit Anti-Ia-Serum und Komplement abgetöteten Zellen bestimmt.

In beiden Fällen verwendeten wir als T-Zell-Marker ein von uns hergestelltes und spezifisch gemachtes Anti-T-Zell-Globulin (sATG), dessen Spezifitätsschritte in dieser Arbeit ebenfalls dokumentiert werden.

Die hier auf ein Vorhandensein Ia-positiver T-Zellpopulationen untersuchten Lymphozyten waren nicht experimentell stimuliert worden. Trotzdem wurden übereinstimmend sowohl mit der Immunfluoreszenz als auch auf zytotoxischem Wege Werte zwischen 2% und 6% sicher Ia-Alloantigentragender T-Lymphozyten nachgewiesen.

Es kann deshalb als neues Ergebnis angenommen werden, daß diese Ia-positiven T-Zellsubgruppen zu einem kleinen Prozentsatz in peripheren Lymphozytenpopulationen bereits ohne und unabhängig von einer stimulierenden Antigen-Exposition vorliegen. Im ausgereiften Immunsystem des Men-

schen werden hiermit am ehesten funktionell geprägte Vorläufer-T-Zellen erfaßt, die im Falle eines spezifischen Antigenreizes lediglich quantitativ amplifiziert werden, ein Befund, der für das Verständnis der Vorgänge einer natürlichen Immunregulation durch Ia-positive T-Zellen einen neuen Aspekt liefert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 AIUTI, F. and H. WIGZELL:
Function and Distribution Pattern of Human T Lymphocytes. I. Production of Anti-T Lymphocyte Specific Sera as Estimated by Cytotoxicity and Elimination of Function of Lymphocytes.
Clin. Exp. Immunol. 13, 171 - 181 (1973)

2 AIUTI, F. and H. WIGZELL:
Function and Distribution Pattern of Human T Lymphocytes. II. Presence of T Lymphocytes in Normal Humans and in Humans with Various Immunodeficiency Disorders.
Clin. Exp. Immunol. 13, 183 - 189 (1973)

3 BACKHAUSZ, R.:
Immunodiffusion und Immunoelektrophorese
Fischer Verlag, Jena 1967

4 BENACERRAF, B. and D.H. KATZ:
The Histocompatibility-Linked Immune Response Genes.
Advances Cancer Res., 121 - 173 (1975)

5 BÖYUM, A.:
Separation of Leukocytes from Blood and Bone Marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl.), 97 - 107 (1968)

6 BROCHIER, J., Y.A. ABOU-HAMED, J.P. GUEHO and J.P. REVILLARD:
Study of Human T and B Lymphocytes with Heterologous Antisera. I. Preparation, Specificity and Properties of Antisera.
J. Immunol. 31, 749 - 758 (1976)

7 CAMPBELL, D.H., J.S. GARVEY, N.E. CREMER and D.H. SUSSDORF:
Methods in Immunology
Benjamin, New-York-Amsterdam (1963)

8 CANTOR, H. and E.A. BOYSE:
Functional Subclasses of T-Lymphocytes Bearing Different Ly Antigens. I. The Generation of Functionally Distinct T-Cell-Subclasses is a Differentiative Process Independent of Antigen.
J. Exp. Med. 141, 1376 - 1389 (1975)

9 DAVID, C., T. MEO, J. McCORMICK and D. SHREFFLER:
Expression of Individual Ia Specificities on T and B Cells. I. Studies with Mitogen-Induced Blast Cells.
J. Exp. Med. 143, 218 - 224 (1976)

10 DAVIS, D.A.C. and N.A. STAINES:
A Cardinal Role for I-Region Antigens (Ia) in Immunological Enhancement, and the Clinical Applications.
Transplant. Rev. 30, 18 (1976)

11 DICKLER, H.B. and H.G. KUNKEL:
Interaction of Aggregated Gammaglobulin with B-Lymphocytes.
J. Exp. Med. 136, 191 -196 (1972)

12 DICKLER, H.B., N.F. ADKINSON jun. and W.D. TERRY:
Evidence for Individual Human Peripheral Blood Lymphocytes Bearing Both B and T Cell Markers.
Nature 247, 213 - 215 (1974)

13 DORVAL, G., K.I. WELSH and H. WIGZELL:
Labeled Staphylococcal Protein A as an Immunological Probe in the Analysis of Cell Surface Markers.
Scand. J. Immunol. 3, 405 - 411 (1974)

14 EISEN, H.N.:
Immunology
In: Microbiology
Edited by Davis et al.
Harper & Row, New York - Evanston - San Francisco - London 1974

15 FATHMAN, C.G., J.L. CONE, S.O. SHARROW, H. TYRER and D.H. SACHS:
Ia Alloantigen(s) Detected on Thymocytes by Use of a Fluorescence-Activated Cell Sorter.
J. Immunol. 115, 584 - 589 (1975)

16 FRELINGER, J.A., J.E. NIEDERHUBER, C.S. DAVID and D.C. SHREFFLER:
Evidence for the Expression of Ia (H-2 Associated) Antigens on Thymus-Derivel Lymphocytes.
J. Exp. Med. 140, 1273 - 1284 (1974)

17 FRIEMEL, H. und J. BROCK:
Grundlagen der Immunologie.
Akademie -Verlag, Berlin 1974

18 GODING, J.W., E. WHITE and J.J. MARCHOLONIS:
Partial Characterization of Ia Antigens on Murine Thymocytes.
Nature 257, 230 - 231 (1975)

19 GÖTZE, D.:
T(Iat)- and B(Iab)-Cell Alloantigens Determined by the H-2 Linked I Region in Mice.
Immunogenetics 1, 495 - 506 (1975)

20 GOODFELLOW, P., C. BARNSTABLE, E. JONES, W.F. BODMER, M.J. CRUMPTON and D. SNARY:
Production of Specific Antisera to Human B Lymphocytes.
Tissue Antigens 7, 105 - 117 (1976)

21 HÄMMERLING, G.J., B.D. DEAK, G. MAUVE, U. HÄMMERLING and H.O. McDEVITT:
B Lymphocyte Alloantigens Controlled by the I Region of the Major Histocompatibility Complex in Mice.
Immunogenetics 1, 68 - 81 (1974)

22 HÄMMERLING, G.H., G. MAUVE, E. GOLDBERG and H.O. McDEVITT:
Tissue Distribution of Ia Antigens: Ia on Spermatozoa, Macrophages and Epidermal Cells.
Immunogenetics 1, 428 - 437 (1975)

23 HERZENBERG, L.A., K. OKUMURA, H. CANTOR, V.L. SATO, F.-W. SHEN, E.A. BOYSE and L.A. HERZENBERG:
T-Cell Regulation of Antibody Responses: Demonstration of Allotype-Specific Helper T Cells and Their Specific Removal by Suppressor T Cells.
J. Exp. Med 144, 330 - 344 (1976)

24 VII. INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKSHOP CONFERENCE
Oxford 1977

25 ISAC, R. and E. MOZES:
Antigen-Specific T-Cell Factors: A Fine Analysis of Specificity
J. Immunol. 118,2, 584 - 588 (1977)

26 ISHII, Y., H. KOSHIBA, H. UEMO, K. IMAI and K. KIKUCHI:
Surface Antigenic Specificities of Human Thymus-Derived Lymphocytes.
Clin.Exp. Immunol. 19, 67 - 74 (1975)

27 JONDAL, M., G. HOHN and H. WIGZELL:
Surface Markers on Human T and B Lymphocytes. I. A Large Population of Lymphocytes Forming Non-Immune Rosettes with Sheep Red Blood Cells.
J. Exp. Med. 136, 207 - 215 (1972)

28 KERBEL, R.S.:
Fc Receptors and Ia Antigens: A Postscript
Nature 257, 180 - 181 (1975)

29 KLEIN, J. and V. HAUPTFELD:
Ia Antigens: Their Serology, Molecular Relationships, and their Role in Allograft Rejections.
Transplant. Rev. 30, 83 (1976)

30 KOSHIBA, H., Y. ISHII, N. YAMANAKA and K. KIKUCHI:
Identification of Human Peripheral T Cell Antigens.
J. Immunol. 118,2, 625 - 629 (1977)

31 LUKASEWYCZ, O.A. and J.A. FREILINGER:
Immune Mechanisms in Leukemia.
J. Exp. Med. 145, 1077 - 1081 (1977)

32 MARCHALONIS, J.J.:
Lymphocyte Surface Immunoglobulins. Molecular Properties and Function as Receptors for Antigen are Discussed.
Science 190, 20 - 29 (1975)

33 MARTEL, J.L., S. JARAMILLO, F.H. ALLEN jun. and P. RUBINSTEIN:
Serology for Automated Cytotoxicity Assays. Contrast Fluorescence Test.
Vox. Sang. 27, 13 - 20 (1974)

34 MURPHY, D.B., L.A. HERZENBERG, K. OKUMURA, L.A. HERZENBERG and H.O. McDEVITT:
A New I Subregion (I-J) Marked by a Locus (Ia-4) Controlling Surface Determinants on Suppressor T Lymphocytes.
J. Exp. Med. 144, 699 - 712 (1976)

35 NIEDERHUBER, J.E. and J.A. FRELLINGER:
Expression of Ia Antigens on T and B Cells and their Relationship to Immune-Response Functions.
Transplant. Rev. 30, 101 (1976)

36 OKUMURA, K. and T. TADA:
Regulation of Homocytotropic Antibody Formation in the Rat. VI. Inhibitory Effect of Thymocytes on the Homocytotropic Antibody Response.
J. Immunol. 107,6, 1682 - 1689 (1971)

37 OKUMURA, K., L.A. HERZENBERG, D.B. MURPHY, H.O. McDEVITT and L.A. HERZENBERG:
Selective Expression of H-2 (I-Region) Loci Controlling Determinants on Helper and Suppressor T Lymphocytes.
J. Exp. Med. 144, 685 - 698 (1976)

38 OWEN, F.L. and M.W. FANGER:
Studies of the Human T-Lymphocyte Population. I. The Development and Characterization of a Specific Anti-Human T-Cell Antibody.
J. Immunol. 113,4, 1128 - 1137 (1974)

39 RODT, H., S. THIERFELDER, E. THIEL, D. GÖTZE, B. NETZEL, D. HUHN and M. EULITZ:
Identification and Quantitation of Human T Cell Antigen by Antisera Purified from Antibodies Crossreacting with Hemopoietic Progenitors and Other Blood Cells.
Immunogenetics 2, 411 - 430 (1975)

40 RODT, H., E. THIEL, S. THIERFELDER, D. HUHN, D. GÖTZE und G. BREHM:
Spezifisches Anti-T-Lymphozyten-Globulin (sATG) für die Diagnostik lymphoproliferativer Erkrankungen.
Klin. Wschr. 54, 361 - 366 (1976)

41 v. ROOD, J.J., A.v. LEEUWEN and J.S. PLOEM:
A Method to Detect Simultaneously Two Cell Populations by Two Colour Fluorescence. Its Application for the Recognition of B Cell (Ia Like) Determinants.
Nature Vol. 262, 795 - 797 (1976)

42 SACHS, D.H. and J.L. CONE:
A Mouse B-Cell Alloantigen Determined by Gene(s) Linked to the Major Histocompatibility Complex.
J. Exp. Med. 138,2, 1289 - 1304 (1973)

43 SHIKU, H., E.A. BOYSE and H.F. OETTGEN:
Immunogenetic Identification of Functional T-Cell Subsets.
Transplant. Proc. 8,3, 381 - 385 (1976)

44 SHREFFLER, D., C. DAVID, D. GÖTZE, J. KLEIN, H.O. McDEVITT and D. SACHS:
Brief Communication: Genetic Nomenclature for New Lymphocyte Antigens Controlled by the I Region of the H-2 Complex
Immunogenetics 1, 189 - 190 (1974)

45 SMITH, R.W., W.D. TERY, D.N. BUELL and K.W. SELL:
An Antigenic Marker for Human Thymic Lymphocytes.
J. Immunol. 110,3, 884 - 887 (1973)

46 STASHENKO, P.P. and S.F. SCHLOSSMAN:
Antigen Recognition: The Specificity of an Isolated T Lymphocyte Population.
J. Immunol. 118,2, 544 - 550 (1977)

47 TADA, T., K. OKUMURA and M. TANIGUCHI:
Regulation of Homocytotropic Antibody Response VII. Carrier Functions in the Anti-Hapten Homocytotropic Antibody Response.
J. Immunol. 108,6, 1535 -1541 (1972)

48 TADA, T., K. OKUMURA and M. TANIGUCHI:
Regulation of Homocytotropic Antibody Formation in the Rat. VIII. An Antigen-Specific T Cell Factor that Regulates Anti-Hapten Homocytotropic Antibody Response.
J. Immunol. 111,3, 952 - 961 (1973)

49 TADA, T., M. TANIGUCHI and C.S. DAVID:
Properties of the Antigen-Specific Suppressiv T-Cell Factor in the Regulation of Antibody Response of the Mouse. IV. Special Subregion Assignment of the Gene(s) that codes for the Suppressive T-Cell-Factor in the H-2 Histocompatibility Comple .
J. Immunol. 144, 713 - 725 (1976)

50 TANIGUCHI, M., T. TADA and T. TOKUHISA:
Properties of the Antigen-Specific Suppressive T-Cell-Factor in the Regulation of Antibody Response of the Mouse.
III. Dual Gene Control of the T-Cell-Mediated Suppression of the Antibody Response.
J. Exp. Med. 144, 20 - 31 (1976)

51 TOURAINE, J.L., F. TOURAINE, D.F. KISZKISS, Y.S. CHOI and R.A. GOOD.
Heterologous Specific Antiserum for Identification of Human T Lymphocytes.
Clin. Exp. Immunol. 16, 503 - 520 (1974)

52 TURIANSKYJ, F.H. and L. GYENES:
The Effect of Neuraminidase on the Sensitivity of Tumor Cells Toward Lysis by Antibody and Complement or by Sensitized Lymphocytes.
In: Transplantation 22,1, p.25
The Willians & Wilkins Co, 1976

53 VADAS, M.A., J.F.A.P. MILLER, I.F.C. McKENZIE, S.E. CHISM, F.-W. SHEN, E.A. BOYSE, J.R. GAMBLE and A.M. WHITELAW:
Ly and Ia Antigen Phenotypes of T Cells Involved in Delayed Type Hypersensitivity and Suppression.
J. Exp. Med. 144, 10 - 19 (1976)

54 VITETTA, E.S., J. KLEIN and J.W. UHR:
Partial Characterization of Ia Antigens from Murine Lymphoid Cells.
Immunogenetics 1, 82 - 90 (1974)

55 WERNET, P.:
Progress in the Serological Detection and Chemical Characterization of Human Ia-Type Membrane Determinants with Correlation to LD-Typing.
In: Histocompatibility Testing 1975, pp. 767 - 768. Ed. by Kissmeyer-Nielsen
Published by Munksgaard, Copenhagen, Denmark

56 WERNET, P., E.P. RIEBER, R.J. WINCHESTER and H.G. KUNKEL:
Rapid and Easy Screening for HL-B Specific (Ia-Type) Antibodies in Pregnancy Sera by the Use of Quantitative Inhibition of Radiolabeled Aggregate Uptake on LD Typed Lymphoid B Cell Lines.
In: Histocompatibility Testing 1975, pp. 647 - 650. Ed. by Kissmeyer-Nielsen
Published by Munksgaard, Copenhagen, Denmark

57 WERNET, P., R.J. WINCHESTER, B. DUPONT and H.G. KUNKEL:
Serological Aspects of Human Alloantigen System with Restricted Tissue Distribution, the Equivalent of the Murine Ia-System ?
In: Histocompatibility Testing 1975, pp. 637 - 642
Ed. by Kissmeyer-Nielsen
Published by Munksgaard, Copenhagen, Denmark

58 WERNET, P., R.J. WINCHESTER, H.G. KUNKEL, D. WERNET, M. GIPHART, A.v. LEEUWEN and J.J.v.ROOD:
Serological Detection and Partial Characterization of Human MLC Determinants with Special Reference to B-Cell Specificity.
Transplant. Proc. 7, Suppl.1, 193 (1975)

59 WERNET, P.:
Human Ia-Type Alloantigens: Methods of Detection, Aspects of Chemistry and Biology, Markers for Disease States.
Transplant. Rev. 30, Art.12, 272 - 298 (1976)

60 WERNET, P., C.BETSCH, P. BARTH, F. SCHUNTER, H.D. WALLER and K. WILMS:
Human Ia Alloantigens as Cell Differentiation Markers of Normal and Pathologic Leukocyte Surfaces.
Scand. J. Immunol. 6, 563 - 574 (1977)

61 WERNET, P., F. SCHUNTER, K. WILMS and H.D. WALLER:
New Aspects in the Classification of Leukemic Cell Types by Ia Alloantigens and Complement Receptors.
In: Haematology and Blood Transfusion, Vol. 20: Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas, pp. 333 - 339
Ed.by S.Thierfelder, H. Rodt, E.Thiel
Springer, Berlin - Heidelberg 1977

62 WILSON, J.D. and G.J.V. NOSSAL:
Identification of Human T and B Lymphocytes in Normal Peripheral Blood and in Chronic Lymphocytic Leukemia.
Lancet, 766 - 791 (1971)

63 WINCHESTER, R.J., S.M. FU, P. WERNET, H.G. KUNKEL, B. DUPONT and C. JERSILD:
Recognition by Pregnancy Serums of non-HL-A Alloantigens Selectively Expressed on B Lymphocytes.
J. Exp. Med. 141, 924 (1975)

64 WOODY, J.N., A. AHMED, R.C. KNUDSEN, D.M. STRONG and K.W. SELL:
Human T-Cell Heterogeneity as Delineated with a Specific Human Thymus Lymphocyte Antiserum. In Vitro Effects on Mitogen Response, Mixed Leukocyte Culture, Cell-Mediated Lymphocytotoxicity, and Lymphokine Production.
J. Clin. Invest. 55, 956 - 966 (1975)

65 WYBRAN, J., M.C. CARR and H.H. FUDENBERG:
The Human Rosette-Forming Cell as a Marker of a Population of Thymus-Derived Cells.
J. Clin. Invest. 51, 2537 - 2543 (1972)

66 YEFENOF, E., G. KLEIN, M. JONDAL and M.B.A. OLDSTONE:
Surface Markers on Human B- and -Lymphocytes. IX, Two Colour Immunofluorescence Studies on the Association Between EBV Receptors and Complement Receptors on the Surface of Lymphoid Cell Lines.
Int. J. Cancer 17, 693 - 700 (1976)

Dank

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.D. Waller für die Überlassung des Themas und für seine wertvolle Unterstützung.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. P. Wernet, in dessen Labor und unter dessen Leitung die experimentellen Arbeiten durchgeführt wurden, sowie Herrn Dr. rer. nat. D. Baron und Mr. und Mss. Stuart Balaban für die wissenschaftliche Anleitung.

LEBENSLAUF

Am 22. Dezember 1953 wurde ich, Christine Betsch, als zweite Tochter des Helmut Betsch, jetzt Dekan i.R., und seiner Frau Luise, geb. Hampp, in Stuttgart geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule, dann bis 1965 das Gymnasium Künzelsau. Am 13. Juni 1972 legte ich am mathema= tisch - naturwissenschaftlichen Gymnasium in Nagold das Abitur ab.

In Tübingen studierte ich von Oktober 1972 an zunächst acht Semester Chemie, im April 1973 nahm ich zusätzlich das Medizin= studium auf. Im März 1975 legte ich das Physikum ab, ein Jahr darauf den ersten Abschnitt und im August 1978 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Die Ausbildung im Praktischen Jahr erhielt ich an den Städtischen Krankenanstalten Esslingen. Dort legte ich am 22. Oktober 1979 den letzten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.